



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN  
ANIMAL**

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS  
DE GONADOTROPINA CORIÓICA EN GESTACIONES  
DE CABALLO Y BURRO**

**T E S I S:**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD  
ANIMAL**

**P R E S E N T A:**

**BEATRIZ ADRIANA MENESES BALBOA**

**ASESOR:**

**FMVZ-UNAM DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA**

**COMITÉ TUTORAL**

**FMVZ- UNAM DR. GERARDO PERERA MARÍN**

**DR. JAIME GALLEGOS**  
**Maestría en Ciencias de la Salud y Producción Animal**

**MÉXICO D.F. marzo del 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DECLARACIÓN**

La autora da el consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario

---

Beatriz Adriana Meneses Balboa

## **DEDICATORIAS**

**A mi hija:**

**María José**

Por darme el motivo y las fuerzas para seguir adelante y de este modo ser un ejemplo  
para ti de tenacidad y esfuerzo

TE AMO POR TODA LA ETERNIDAD

**A mis padres:**

**José Alejandro Adrián Meneses Castañón y Patricia Balboa Aguirre**

porque sin ustedes y su ejemplo no estaría aquí, por ser mis pilares para enfrentar  
todas las vicisitudes de la vida y por estar “ahí” siempre para mí

LOS AMO

**A MI AMOR:**

**José Daniel García Silva**

por ser mi compañero, amigo y cómplice en todo momento, por estar aquí a pesar de  
todo. Gracias por tu apoyo incondicional e invaluable que me has ofrecido desde que nos  
conocimos, gracias por ser parte de mi experiencia de vida

TE AMO

**A mis abuelos**

**Raymundo Balboa Delgado y Ma. De la Luz Aguirre de Balboa**

por su apoyo y cariño que siempre nos demostraron a mi hija y a mí. Dónde quiera que  
estén sé que estarán orgullosos de mí

**A todos los integrantes del Departamento de Reproducción (Académicos,  
Técnicos Académicos, Ayudantes de Profesor y Estudiantes tanto de Licenciatura  
como de Posgrado)**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACYT)**

por haberme brindado y financiado mis estudios de Posgrado

**A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**

por darme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y posgrado y poder decir que soy orgullosamente PUMA

**A los Laboratorios SANFER- MÉXICO E INTERVET- MÉXICO**

por los productos comerciales que donaron para la realización de este proyecto

**Al Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México**

por su apoyo en la realización del bioensayo, parte importante durante mi trabajo de investigación

**Al Dr. José Gerardo Perera-Marín**

muy en especial por sus conocimientos, apoyo e interés porque yo terminará este proyecto

**Al MPA Carlos Esquivel Lacroix**

Por brindarme su amistad, consejos, conocimientos y permitirme formar parte de su equipo de trabajo

## RESUMEN

**Purificación y caracterización de las isoformas de la Gonadotropina coriónica (GC) en gestaciones de caballo y burro.** Meneses BA, Boeta AM, Perera-Marín G, Gallegos J. La gonadotropina coriónica (GC), al igual que los otros miembros de la familia de glicoproteínas de origen hipofisario, son producidas y secretadas en múltiples isoformas debido a sus diferentes patrones de glicosilación. Actualmente no existe información sobre las características de heterogeneidad molecular de la GC presente en el suero de gestaciones intraespecie de équidos (yegua-caballo y burra-burro). Por tal motivo, el objetivo del presente estudio se encaminó al análisis del patrón de distribución de isoformas de la GC en estas gestaciones. Para esto, se realizó la extracción y purificación de la GC a partir de suero sanguíneo de hembras équidas gestantes, seguido de la caracterización del patrón de distribución de sus isoformas. La extracción de GC se hizo con etanol a pH neutro y ácido. Una vez obtenida la fracción rica en GC, se purificó por medio de cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). En el caso de yeguas, la tercera fracción fue la más rica en eCG y se analizó mediante cromatoenfoco, el cual permite identificar proteínas con diferentes puntos isoeléctricos. La concentración inmunoreactiva a CG en cada paso del proceso de extracción, purificación y análisis de la heterogeneidad molecular, se determinó mediante el sistema ELISA para gonadotropina coriónica equina. El patrón de distribución de las isoformas de la eCG purificada del suero de yeguas, indicó un alto porcentaje de isoformas de tipo ácido. Por otro lado, la extracción y purificación de gonadotropina coriónica de burro a partir de suero de burras gestantes se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas para la eCG, siendo ésta sin resultado alguno debido al estuche comercial de ELISA utilizado, el cual determina específicamente la presencia de eCG. Por tal motivo se recurrió a un bioensayo de incremento ovárico y uterino en ratas prepúberes de la cepa Wistar, en el cual los resultados obtenidos no fueron convincentes probablemente a la falta de concentración en las muestras utilizadas y/o a la inactivación de la hormona por alguna modificación en el pH durante los procesos de extracción y purificación.

**Palabras clave:** gonadotropina coriónica, placenta, copas endometriales, gestaciones intraespecie, caballo, burro.

## SUMMARY

The isomorphic purification and the characterization of the chorionic gonadotrophin (GC) in horse and donkeys gestation. Meneses BA, Boeta AM, Perera-Marín G, Gallegos J. As other family members of the hypophysary glycoprotein . Due to its different glycosilation patterns, the chorionic gonadotrophin (GC) is produced and secreted in multiple isoforms, Currently, there is no information about the molecular heterogeneity characteristics of the GC present in the intra-species gestation serum in (mare-male and jenny-jack) equines. For this reason, the objective of this study is aimed to the analysis of the GC isoform distribution pattern in these gestations. In this regard, the GC extraction and purification was made from equine gestation female's plasma serum, followed by the characterization of the isoform distribution pattern. The GC extraction was made with an acid and a neutral pH ethanol. Once a rich GC fraction was obtained, it was purified by a cationic exchange chromatography, (CM-Sepharosa). In the case of mares, the third fraction was the richest in eGC and was analyzed by cromato-approach, which allows to identify proteins with different isoelectric points. The immunoreactive concentration to CG in each step of the molecular extraction, purification , and heterogeneity analysis process, was determined by the ELISA system for equine chorionic gonadotrophin. The distribution pattern of the isoform eGC of the male serum, showed a high percentage of acid type isoforms. On the other hand, the jack's chorionic pH in (dGC) from gestation jennys was done under the same conditions used in the eGC, being this with no result due to the ELISA's commercial kit used in this test, which specifically determines the presence of the eGC. Therefore we had to do an uterine and ovarian increase bioassay in Wistar strain pre-pubertal rats, but, probably, because of the lack of concentration in the samples used and, or, the inactivation of the hormone by any pH modification during the extraction and purification processes, the results obtained in this study were not convincing.

**Keywords:** chorionic gonadotrophin, placenta, endometrials cups, intraespecie embryo, horse, donkey

## CONTENIDO

	PAGINA
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
CONTENIDO	V
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVOS GENERAL	2
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	2
3. HIPÓTESIS	2
4. REVISIÓN DE LITERATURA	3
4.1 La gonadotropina coriónica equina	3
4.1.1 Estructura de la Gonadotropina coriónica equina	3
4.1.2 Subunidad alfa	5
4.1.3 Subunidad beta	7
4.2 Gonadotropina coriónica de burro	8
4.3 Heterogeneidad molecular de las gonadotropinas	10
4.3.1 Papel de los carbohidratos	13
4.3.2 Actividad biológica	15
4.3.3 Regulación de la secreción	15
4.3.4 Mecanismo de acción	16
4.4 Fisiología de la gestación temprana en la yegua	17
4.4.1 Cuerpo lúteo	17
4.4.1.1 Desarrollo del cuerpo lúteo	17
4.4.1.2 Cuerpo lúteo primario	17
4.4.1.3 Vida media del cuerpo lúteo primario	18
4.4.1.4 Cuerpos lúteos suplementarios	18
4.4.1.5 Síntesis y secreción de progesterona	19
4.4.2 Reconocimiento de la gestación	21



4.4.2.1 Fijación y orientación	23
4.4.2.2 Rescate del cuerpo lúteo primario	24
4.4.2.3 Placentación	24
4.4.2.4 Desarrollo de membranas	24
4.4.3 Copas endometriales	26
4.4.3.1 Formación y desarrollo de copas endometriales	26
4.4.3.2 Destrucción de copas endometriales	28
4.4.3.3 Secreción y función de la gonadotropina coriónica equina	29
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA	31
5.1 Localización y Animales Experimentales	31
5.1.1 Hembras	31
5.1.2 Machos	31
5.1.3 Alimentación	31
5.1.4 Inseminación	32
5.1.5 Diagnóstico de gestación	32
5.2 Actividad ovárica	32
5.2.1 Recolección de sangre	33
5.2.2 Determinación hormonal	33
5.2.2.1 Progesterona	33
5.2.2.2 Gonadotropina coriónica equina	33
5.3 Extracción y purificación (estandarización del procedimiento)	33
5.3.1 Preparación de la muestra	33
5.3.2 Extracción	34
5.3.3 Purificación	34
5.3.4 Heterogeneidad	35
5.3.5 Extracción y purificación del lote final	36
5.4 Extracción y purificación de la gonadotropina coriónica de burro	37
5.5 Actividad biológica	37
5.5.1 Animales	37
5.5.2 Bioensayo	38
5.5.3 Muestras biológicas	38
5.5.3.1 Suero	38

5.5.3.2 Ovarios y úteros	38
5.5.3.3 Diseño experimental	38
5.6 Análisis estadístico	39
6. RESULTADOS	40
7. DISCUSIÓN	54
8. CONCLUSIONES	59
9. ANEXOS	60
10. LITERATURA CITADA	65

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		PÁGINA
Cuadro 1	Rendimiento durante la extracción de la GC en suero de yegua inseminada con caballo	40
Cuadro 2	Rendimientos durante la purificación de GC de suero	41

	de yegua inseminada con caballo	
Cuadro 3	Rendimientos de los productos obtenidos durante la extracción de eCG de suero de yegua gestante inseminada con caballo (lote final)	42
Cuadro 4	Resultados que resumen el rendimiento de proteína* y su actividad específica de eCG en cada producto recuperado durante la purificación del lote final de eCG, que para su análisis se dividió en tres lotes	48
Cuadro 5	Promedio $\pm$ DE de la concentración de isoformas de eCG y de proteína total en la hormona eCG purificada a partir de suero de yegua inseminada con caballo	50
Cuadro 6	Rendimiento durante la extracción de Gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de con burro	51
Cuadro 7	Rendimiento durante la purificación de Gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de burra con burro	52
Figura 1	Número de cuerpos lúteos acumulados en cruza intra-especie	40
Figura 2	Concentración de progesterona y de eCG del suero de yeguas con gestación equina. Cada punto del gráfico, representa el promedio $\pm$ EE de siete animales. La producción de cada hormona se comparó mediante un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, tomando como referencia el pico de producción de la hormona; semana 8 para eCG y semana 9 para progesterona. Para cada hormona los puntos debajo de los corchetes indican niveles similares ( $p>0.05$ ).	41
Figura 3	Niveles circulantes de progesterona en el suero de burra con burro. Cada punto del gráfico, representa el promedio $\pm$ EE de nueve animales	42
Figura 4	Patrón de elución de la GC cruda del suero de yegua gestante, en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). Para ello se aplicaron 120 mg de proteína en la columna (1.5 x 27) equilibrada con acetato de amonio 50mM pH 5.1 y eluída con un flujo de 23ml/h. La fracción no retenida en la columna denominada CM-1ab eluyó con este amortiguador, mientras que las fracciones CM-2ab y CM-2cd se obtuvieron con acetato de amonio 0.1 M pH 6.8, la fracción CM-3ab se obtuvo con acetato de amonio 1M más glicina 0.1M pH 9.5. Se colectaron fracciones de 2 ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280nm.	44
Figura 5	Patrón de elución de la GC cruda en los tres sublotos en que se dividió el lote final de este estudio. En cada sub-lote se utilizó una columna (1.5cm de diámetro x 27 cm de longitud), previamente equilibrada con acetato de amonio 0.05M, pH 5.1 con un flujo de	47

	23ml/h y se colectaron fracciones de 2 ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280nm. En términos generales las fracciones designadas como CM-1ab, CM, 2ab y CM 3ab, se obtuvieron con acetato de amonio 50 M, pH 5.1, acetato de amonio 100mM, pH 6.8 y acetato de amonio 1M en presencia de glicina 0.1M, pH 9.5, respectivamente	
Figura 6	Patrón de elución y gradiente de pH de la fracción CM-3ab obtenida a partir de suero de yegua con gestación tipo equina. La columna de intercambio iónico (PBE-118), fue equilibrada previamente con 0.025 M de trietilamina-HCl, pH 11.0. La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10.5-3.5 y se colectaron fracciones de 2 ml.	49
Figura 7	Patrón de distribución del porcentaje de las isoformas de eCG de la gestación de la craza intra-especie yegua-caballo agrupadas de acuerdo a su pH de elución.	50
Figura 8	Patrón de elución de la GC cruda obtenida de suero de burra, en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna (1.5cm de diámetro x 27 cm de longitud) se equilibró con acetato de amonio 50mM pH 5.1, con un flujo de 23ml/h. Se colectaron fracciones de 2 ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280nm.	52
Figura 9	Evaluación de las fracciones CM-3ab (eCG) de la craza intra-especie yegua- caballo y, 2ab y 3ab de la craza intra-especie burra-burro, en donde A) peso ovárico B) estradiol C) peso uterino.	53

## 1. INTRODUCCIÓN

La gonadotropina coriónica (CG) es una hormona que se encuentra presente durante el primer tercio de la gestación de equinos y burros. Dicha hormona es de tipo glicoproteico, la cual es secretada a partir de las copas endometriales que se originan a partir de células trofoblásticas que se desprenden del cinturón coriónico y que migran e invaden el endometrio materno (Clegg et al, 1954). La secreción de CG se lleva a cabo entre los días 35 -120 de la gestación (Allen et al, 1975).

Esta hormona tiene una función luteotrópica y luteogénica ya que promueve la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo primario y promueve la formación de cuerpos lúteos suplementarios (Stewart et al., 1976; Stewart y Allen, 1981), contribuyendo así a la secreción adicional de progesterona.

Las concentraciones de gonadotropina coriónica en estas dos especies son diferentes entre sí, ya que en la burra los niveles circulantes de esta hormona son casi 6 veces menores a las que encontramos en la yegua (Stewart y Allen, 1981).

Tanto la gonadotropina coriónica equina (eCG) como la gonadotropina coriónica de burro (dCG) tienen ciertas similitudes; una de las cuales es que sus subunidades  $\beta$  se encuentran codificadas por el mismo gen que codifica a la subunidad  $\beta$  de LH de su respectiva especie; además poseen una actividad de FSH cuando son administradas en especies no equinas. Sin embargo estas dos hormonas, también presentan algunas diferencias entre sí en cuanto a su contenido de aminoácidos en su estructura molecular, en la incorporación de oligosacáridos y en consecuencia a su peso molecular.

Estas hormonas al ser parte de la familia de gonadotropinas presentan cierta heterogeneidad molecular, la cual se debe al mecanismo de glicosilación que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso, en donde la incorporación de oligosacáridos a una nueva cadena de proteína resulta de gran relevancia en la actividad biológica de la proteína en cuestión.

Hasta el momento, no existe información alguna sobre la heterogeneidad molecular de la dCG y eCG presente en el suero de gestaciones équidas intraespecie, motivo por el cual nos llevó a la realización de esta investigación

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Analizar la heterogeneidad de la gonadotropina coriónica del suero obtenido a partir de gestaciones intra-especie de équidos (*Equus caballus* y *Equus asinus*).

### 2.2 Objetivos particulares

- Obtención de las isoformas de GC del suero de la yegua y la burra
- Análisis de la heterogeneidad de estas proteínas

## 3. HIPÓTESIS

- El patrón de distribución de isoformas básicas, neutras y ácidas de la gonadotropina coriónica es similar entre yegua y burra.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA

La eCG es una glicoproteína, al igual que la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG); sin embargo las tres primeras se sintetizan en la adenohipófisis y la última en la placenta humana, mientras que la eCG es sintetizada en las copas endometriales provenientes del cinturón coriónico encontrado en el útero del équido gestante. (Allen and Wilsher, 2009; Legardinier *et al*, 2005; Perera-Marín *et al*, 2007, Bousfield *et al*, 2004; Allen and Moor, 1972)

Esta glicoproteína posee una estructura heterodimérica, es decir, se encuentra formada por dos cadenas de aminoácidos o subunidades glicosiladas, unidas entre sí por puentes disulfuro (Bousfield *et al.*, 2001); teniendo así dos subunidades denominadas  $\alpha$  (alfa) y  $\beta$  (beta) (Bousfield *et al.*, 2001;). Tiene un peso molecular aproximadamente de 72kDa (Christakos & Bahl 1979) y su estructura primaria de aminoácidos es idéntica a la LH equina (eLH), por lo tanto estas dos hormonas se unen a los mismos receptores ováricos (Stewart y Allen, 1981; Bousfield, 1996; Legardinier, 2005).

Esta hormona es luteotrópica y luteogénica durante la gestación temprana, ya que promueve la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo primario y promueve la formación de cuerpos lúteos suplementarios (Stewart *et al.*, 1976; Stewart y Allen, 1981).

#### 4.1.1 ESTRUCTURA DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA

La eCG tiene un alto peso molecular, del cual el 45% de su masa está compuesta por carbohidratos y el 10% por ácido siálico; a diferencia de la eLH que contiene 30% de carbohidratos (Roser *et al.* 1984) y tiene muy poco ácido siálico. Los oligosacáridos unidos a la eCG son moléculas de hexosas, hexosaminas y ácido siálico que se encuentran distribuidos de diferente manera en ambas subunidades (Schams y Papkoff, 1972), el contenido de estos oligosacáridos se muestran en la figura 1

Azúcar	
Hexosa	14.3
Hexosamina	20.6
Ácido Siálico	10.2
Total de Carbohidratos	45.1

Figura 1. Composición de Carbohidratos que conforman la estructura química de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Modificada de Schams y Papkoff, 1972)

El análisis realizado de los grupos amino terminal de la gonadotropina coriónica muestran que el grupo final más importante es el aminoácido fenilalanina, sin embargo, también están presentes residuos de glicina y serina (Schams and Papkoff, 1972).

En la década de los 80's, a partir de muestras tomadas de suero y de eCG pura con altos y bajos títulos de esta hormona, se pudieron determinar los aminoácidos que conforman la estructura de la eCG (Prolina, Treonina, Ácido Glutámico y Serina), además se observaron residuos terminales de Fenilalanina y Serina (Figura 2).

	eCG (serum, PMSG)	eCG (high titer)	eCG (low titer)
Lysine	5.4	6.2	5.0
Histidine	2.5	2.3	3.7
Arginine	6.1	6.4	4.7
Aspartic Acid	5.5	6.6	8.7
Threonine	8.6	8.4	5.8
Serine	8.0	8.7	7.2
Glutamic Acid	8.4	9.8	9.3
Proline	12.5	11.7	11.8
Glycine	5.1	5.8	7.9
Alanine	7.5	7.9	8.1
½ Cystine	7.5	6.6	5.2
Valine	4.6	5.9	7.8
Methionine	1.7	1.7	0.7
Isoleucine	4.8	4.7	2.9
Leucine	6.3	7.2	7.8
Tyrosine	2.4	2.3	2.4
Phenylalanine	4.0	5.2	3.5
Amino terminal residues	Phe Ser	Phe Ser	Phe Ser

Fig. 2 Aminoácidos que componen a la Gonadotropina Coriónica Equina  
Schams y Papkoff, 1972



Butnev y colaboradores (1996) aislaron tres formas de gonadotropina coriónica equina a partir de una preparación cruda. Estas preparaciones presentaban secuencias idénticas de aminoácidos pero diferentes pesos moleculares y composiciones de monosacáridos, por lo cual fueron designadas como eCG-L (bajo peso molecular), eCG-M (medio peso molecular), y eCG H-(de alto peso molecular). En dicho estudio no se observaron diferencias en la estructura principal entre cada forma debido a que presentaron la misma secuencia conocida de eCG. La electroforesis en SDS-PAGE de estos preparados en condiciones reductoras, reveló que las diferencias de peso molecular entre ellos se debieron a los diversos tamaños de la subunidad beta. La composición de hidratos de carbono de estas subunidades sugiere un aumento en las uniones tipo-O de su carboxilo terminal en las formas con mayor peso molecular. Al probarse eCG-L, eCG-M y eCG-H en sistemas de ensayo de radioreceptores para LH y FSH donde fueron tratadas primeramente con endo-beta-galactosidasas,, resultó que la eCG-H presentaba menor afinidad al receptor que la eCG-L y eCG-M. La acción de las endo-beta-galactosidasas aumentó la afinidad al receptor de FSH de todas las formas aisladas de eCG, sin embargo, la eCG-H parcialmente deglicosilada sigue siendo la forma menos activa. Por lo tanto, los oligosacáridos O-ligados de la eCG-H ejercen una influencia negativa en su afinidad al receptor.

#### 4.1.2 Subunidad alfa

Como se sabe la subunidad alfa de todas las hormonas glicoproteicas de todos los mamíferos (LH, FSH, TSH, LH y GC) constan de 92 a 96 residuos de aminoácidos dependiendo de la especie, a excepción de la hormona folículo estimulante humana (hFSH), la cual contiene 92 residuos de aminoácidos.

Dicha subunidad presenta una secuencia de residuos de aminoácidos idéntica intraespecie, lo que sugiere que esta proteína es codificada por un único gen que se expresa en la hipófisis de todos los mamíferos y en la placenta de los primates y équidos (Jameson and Hollenberg, 1993; Bousfield et al, 2004). La estructura

primaria de esta subunidad se encuentra absolutamente conservada en todas las hormonas de esta familia dentro de una misma especie. El nivel de homología exhibida en la secuencia de aminoácidos fluctúa entre 76% en equinos y hasta el 100% en humanos.

Estudios realizados en la década de los 90's refieren que la subunidad alfa de la eCG está compuesta por 82 residuos de aminoácidos (Martinuk y Murphy, 1990). Christakos y Bahl en la década de los 70's demostraron que el peso molecular de esta subunidad es de 16.96kDa. Esta subunidad posee el 22% de carbohidratos totales de la proteína (Christakos & Bahl 1979).

La síntesis de esta subunidad está regulada por el Factor de Crecimiento Epidérmico (GFE), el cual se expresa en las células trofoblásticas alrededor del día 30 de la gestación (Theingi et al, 2001)

La subunidad alfa tiene 2 sitios de glicosilación; el primer sitio de glicosilación se localiza en la posición 56 de la secuencia primaria del polipéptido (Asn<sub>56</sub>) y el segundo sitio, se localiza en la posición 82(Asn<sub>82</sub>). En ambos sitios de glicosilación, los oligosacáridos se incorporan a la proteína cuando se presenta la triada Asn-X-The, generalmente en el grupo amida de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Asn), esta unión se conoce como unión de tipo N (Bousfield *et al*, 1992; Bousfield *et al*, 2004).

En estudios realizados por Bousfield, se describió que estos oligosacáridos participan en la traducción de la señal, sitio localizado particularmente en el residuo Asn<sub>52</sub> o Asn<sub>56</sub> (Bousfield *et al*, 1992; Bousfield *et al*, 2004).

En estudios realizados por Chopineau, se sugiere que la subunidad alfa también influye en la especificidad de la acción de estas hormonas, ya que en dichos estudios al combinar la subunidad alfa de cerdo con la subunidad beta LH/CG de burro quedó demostrado que esta hormona recombinante solo poseía actividad de LH de la misma manera en que la combinación de una subunidad beta eLH/CG, fuere de caballo o burro, con la subunidad alfa de la hCG sólo exhibe actividad de LH. (Chopineau et al, 1997).

#### 4.1.3 Subunidad beta

Las subunidades  $\beta$  de las glicoproteínas son codificadas por diferentes genes, por lo cual el nivel de divergencia en la secuencia de aminoácidos mostrada por los distintos tipos de subunidad beta se refleja en la especificidad hormonal de cada una de ellas, esto es, la subunidad  $\beta$  de cada glicoproteína determina su especificidad biológica (Pierce and Parsons, 1981; LeBarbera and Rebar, 1990). Una excepción a la regla, es la que se observa entre las formas de las hormonas LH- $\beta$  y CG- $\beta$  equinas, en donde su estructura es idéntica debido a que ambas subunidades son codificadas por el mismo gen (Stewart & Maher, 1991; Sherman et al., 1992; Smith et al., 1993; Chopineau *et al.*, 1995), lo cual hace que éstas dos exhiban la misma molécula peptídica (Matsui et al, 1994; Legardinier, 2005), pero con diferente patrón de glicosilación, gracias a lo cual presentan diferencias en su actividad biológica.

La subunidad  $\beta$  de la eCG posee un peso de 43.12 kDa, del cual 78% corresponde a los carbohidratos totales de la proteína (Chirstakos y Bahl, 1979), y el resto a 6 cadenas de galactosa y ácido siálico.

Gracias a estudios realizados por medio de electroforesis en papel y perfiles de elución a través de columnas Bio-Gel P-4, se encontraron algunas de las principales diferencias entre la subunidad beta de la eCG y la subunidad beta de la eLH. Entre estas diferencias se pueden mencionar que la eCG contiene oligosacáridos neutros y sializados, mientras que subunidad beta de la eLH se encuentra formada por oligosacáridos neutros, sializados y sulfatados; que la masa molecular de oligosacáridos de las dos glicoproteínas son diferentes, lo cual indica que las estructuras de las cadenas Asn-O-unidos de la eCG beta y beta eLH son diferentes, aunque tengan una secuencia de aminoácidos idéntica.

Una característica única estructural de la gonadotropina coriónica de los primates y de la gonadotropina coriónica equina es que presentan sitios de glicosilación del tipo O-unidos en el carboxilo terminal de la secuencia primaria de aminoácidos presentes en la subunidad beta. Este tipo de glicosilación parece prolongar la vida media de estas hormonas en circulación, que en el caso específico de la eCG es de aproximadamente 7 días (Bousfield et al, 2004). La

subunidad beta de la eCG, específicamente, presenta 14 sitios de glicosilación de los cuales son 2 tipo N-unidos y 12 O-unidos (Bousfield et al 2001, Legardinier, 2005)

Recientemente fueron descritas isoformas de eCG que exhiben en su subunidad beta las mismas uniones tipo N, pero difieren en sus uniones tipo O.

#### 4.2 Gonadotropina coriónica de burro

El burro al ser un miembro de la familia *equidae* también secreta gonadotropina coriónica durante su gestación, en este caso dicha hormona se ha denominado gonadotropina coriónica de burro (dCG) por sus siglas en inglés. Los niveles reportados de gonadotropina en esta especie son mucho menores que los reportados en la yegua (20-50 UI/ml) presentando un pico máximo entre los días 50 a 60 de la gestación (Allen et al, 1975). Posee una vida media en circulación de aproximadamente de 26 horas.

La (dCG) ha sido aislada y purificada a partir del suero de burras gestantes usando la misma metodología empleada previamente para la purificación de la eCG. La dCG es similar a la eCG en su naturaleza glicoproteica, sin embargo, la dCG posee menos carbohidratos, 31%, (figura 3) y presenta diferencias en la composición de sus aminoácidos, como la presencia de 1 residuo terminal de fenilalanina y numerosos residuos de tirosina. La dCG presenta además diferencias en su radio de bioactividad LH/FSH, que se refleja en una actividad menor de FSH en especies no equinas en comparación a la actividad que presenta la eCG.

<b>Azúcar</b>	<b>g/ 100g de glicoproteína</b>
Hexosa	13.2
Hexosamina	11.2
Ácido siálico	6.8
Total de carbohidratos	31.2

Figura 3. Composición de carbohidratos que conforman la estructura química de gonadotropina coriónica de burro. (Modificada de Aggarwal et al, 1980)

Aggarwal (1980), logró determinar la composición de residuos de aminoácidos que conforman la estructura primaria de esta hormona, la cual se presenta en la figura 4.

Aminoácido		Aminoácido	
Lisina	6.1	Alanina	6.5
Histidina	1.9	Cisteína	5.3
Arginina	4.5	Valina	5.0
Ácido Aspártico	5.2	Metionina	1.6
Treonina	9.2	Isoleucina	3.2
Serina	9.0	Leucina	5.7
Ácido Glutámico	7.3	Tirosina	6.6
Prolina	11.6	Fenilalanina	4.0
Glicina	7.4		

Figura 4. Residuos de aminoácidos presentes en la estructura química de gonadotropina coriónica de burro (Modificada de Aggarwal et al., 1980)

En radioinmunoensayos realizados la dCG se presenta una reacción cruzada con eCG, LH equina (eLH) y FSH equina (eFSH) (Aggarwal et al; 1980). En términos de su purificación, naturaleza glicoproteica y tamaño molecular la dCG ha demostrado ser similar a la eCG y a la hCG, tanto así que la concentración tanto de carbohidratos como de ácido siálico que posee la dCG es más parecido al que presenta la hCG (30 y 10% respectivamente) (Bahl, 1973).

La hormona luteinizante de burro (dLH) y la gonadotropina coriónica de burro (dCG) al igual que en el caballo, comparten una estructura idéntica del péptido. La dCG posee una actividad de LH en el burro mismo, además de poseer un comportamiento similar a la FSH en especies no equinas. Esta actividad de FSH es menor cuando se compara con la actividad que muestra la eCG (Aggarwal et al. 1980, Roser et al. 1984). En la literatura se pueden encontrar algunas controversias sobre la actividad de la dCG como FSH en especies heterólogas.

Con el fin de evaluar y comparar la actividades intrínsecas de esta hormona en especies heterólogas, Chopineau y colaboradores en 1997 realizaron un estudio donde trabajaron con gonadotropinas recombinantes de origen equino, humana y de burro expresadas en células COS-7 a las cuales se les evaluó su actividad tanto de LH en bioensayos de células de Leydig de ratas, como su actividad de

FSH en un bioensayo con células Y1. Los resultados mostraron que, la dLH/CG fue aproximadamente dos veces más activa que la hormona eLH / CG en el bioensayo para LH, y que era cinco veces menos activa que eLH/CG en el bioensayo para FSH. Estos resultados confirman que la dLH/CG no posee actividad de FSH significativa en especies heterólogas. Por lo tanto, la dCG actúa predominantemente como LH en pruebas biológicas. En ensayos *in vitro* con células de Leydig en ratas, la dCG fue tan activa como la eCG, pero en ensayos *in vitro* realizados en túbulos seminíferos de rata se demostró que su actividad como FSH fue considerablemente menor que la presentada por la eCG. Por otra parte en estudios de radioreceptores para LH y FSH realizados en testículos de ratas ha quedado demostrado que la dCG posee una actividad nueve veces más potente como LH que como FSH.

En la estructura de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica de burro se han descubierto algunas diferencias en la composición de sus aminoácidos en comparación a la gonadotropina coriónica equina. Estas diferencias se localizan en las posiciones 51, 94, 95, 102, 103 y 106 (Chopineau et al. 1999), y dentro de estas seis diferencias, dos (posiciones 102 -103) son particularmente interesantes: ya que además de estar ubicado en la región 100-110, presentan similitudes en la LH o FSH de todas las especies. De hecho, la dLH / CG exhibe residuos de Prolina y Glicina en las posiciones 102 -103, como todas las LHs (Combarous, 1992).

#### 4.3 HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LAS GONADOTROPINAS

La heterogeneidad molecular que presentan las gonadotropinas se debe al mecanismo de glicosilación que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso. Este mecanismo es la incorporación de oligosacáridos a una cadena nueva de proteína y que se inicia con la transferencia de una molécula de dolicol pirofosfórico, la cual lleva unida una secuencia de 2 moléculas de N-acetilglucosamina, 9 manosas y 3 glucosas. Esta secuencia se une al sitio de localización del residuo de asparagina- X- treonina; dicho proceso es regulado por la enzima glicosiltransferasa. Posteriormente el oligosacárido sufre una serie de

modificaciones estructurales, las cuales son reguladas por diferentes enzimas entre ellas las exoglucosidasas y manosidasas. Por último a la estructura resultante se le van incorporando moléculas de N-acetilgalactosamina, galactosas, ácido siálico y/o sulfato, proceso que también se encuentra regulado por diferentes enzimas (N-acetilglucosamina transferasa, N-acetilgalactosamina, Sialiltransferasa y N-acetilgalactosil transferasa); dando así forma a diferentes glicoformas (Combarous, 1992). Una vez formado el dímero, se lleva a cabo el corte de glucosas y manosas hasta llegar a 5 manosas y 2 N-acetilglucosamina (Man5GlcNAc2) para posteriormente unir los oligosacáridos al núcleo común de la proteína, este paso se lleva a cabo en el *medial*-Golgi y *trans*-Golgi, con el fin de formar el oligosacárido maduro. Estos carbohidratos intermedios resultantes del proceso post-traduccionales unidos a la proteína son responsables de muchas de las glicoformas sintetizadas y secretadas por la hipófisis y la placenta (Baenziger 1988, Ulloa-Aguirre 1995). En la figura 5, se esquematiza la ruta biosintética que siguen los oligosacáridos durante el proceso de glicosilación de las gonadotropinas.

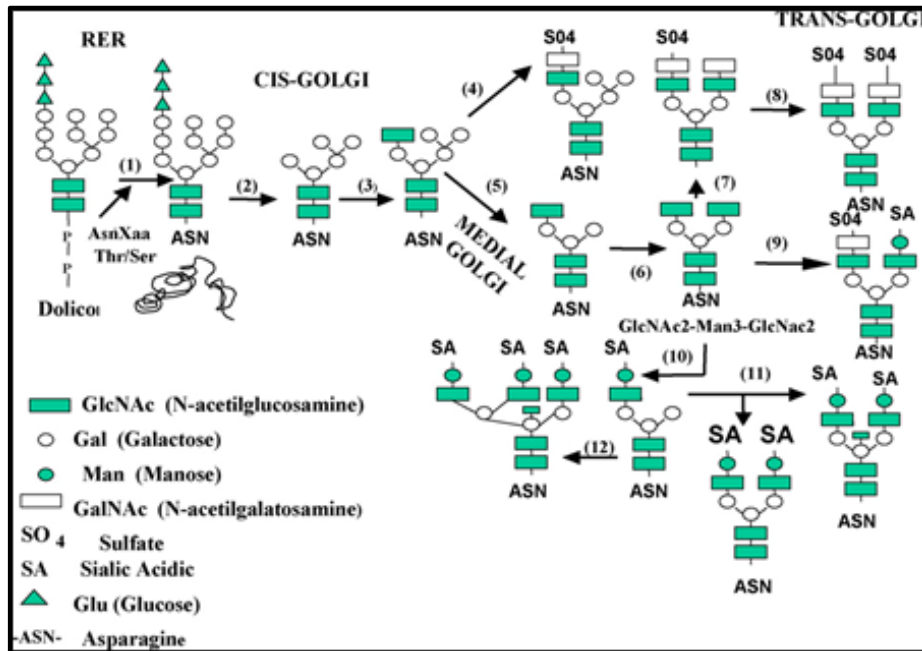


Figura 5. Ruta biosintética de los oligosacáridos N-unidos en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la gonadotropina. (1) Glicosiltransferasa, (2) glucosidasa I y II, Manosidasa 1 y 2; acetilglucosamina transferasa; (4) sulfotransferasa; (5) Manosidasa 1 y 2; acetilglucosamina transferasa; (7) N-acetilgalactosamina transferasa y sulfato transferasa; (8) sulfato transferasa; (9) N-acetilgalactosamina transferasa, sulfato transferasa, galacto transferasa y sialil transferasa; (10) galactosil transferasa y sialil transferasa; (11 y 12) acetilgalactosamina transferasa, galactosil transferasa y sialil transferasa, respectivamente (Tomado de Perera et al, 2007)

La heterogeneidad de la eCG se relaciona al patrón de glicosilación de ésta. Así, se ha descrito que la LH equina posee en su cadena de oligosacáridos un residuo final de sulfato, en tanto que la eCG, presenta residuos finales de ácido siálico (Perera-Marín *et al*, 2007; Kardana *et al*, 1991); variación que se considera como la base química para la identificación de la heterogeneidad molecular y de carga observada en las glicoproteínas (Baenzinger *et al.*, 1992).

Estudios anteriores han demostrado que las propiedades de la eCG pueden variar dependiendo del material a partir del cual sea purificada (Papkoff *et al*, 1978; Aggarwal *et al*, 1980<sup>a</sup>; Aggarwal *et al*, 1980; Papkoff, 1981)), por tal motivo, Bousfield y colaboradores en 2001 realizaron un estudio donde se purificó dicha hormona a partir de suero de yegua gestante y de copas endometriales. En dicho estudio se demostró que ambas preparaciones fueron muy similares, sin embargo se encontraron algunas diferencias en el contenido de residuos de Arginina,



Glutamina, Valina, Isoleucina, Tirosina y Arginina; además de una diferencia en el contenido de sus carbohidratos siendo la preparación de eCG obtenida a partir de las copas endometriales la que presentó un mayor porcentaje de ellos (6%). Esta última observación es consistente con los datos previamente publicados que sugieren que la heterogeneidad de las gonadotropinas se debe principalmente a diferencias en la glicosilación. También se pudo observar variaciones en el contenido de hexosas y hexosaminas. A pesar de estas diferencias bioquímicas relativamente sin importancia entre las dos fracciones, la eCG purificada a partir de las copas endometriales resultó ser dos veces más activa que la eCG de suero en bioensayos realizados en células de Leydig de rata. Esta diferencia en la actividad biológica no se reflejó en bioensayos realizados en testículos de equinos donde la unión al receptor eLH/eCG fue comparativamente activa.

#### 4.3.1 Papel de los carbohidratos

Los carbohidratos que conforman a las cadenas de las glicoproteínas influyen tanto en el peso como en la carga de las mismas. A través de diversos estudios se han identificado y purificado múltiples formas de estas proteínas, utilizando técnicas que separan proteínas de acuerdo a su carga eléctrica y su peso molecular (Hearn and Gomme, 2000; Perera-Marín et al, 2005;).

Así, se han identificado tres principales grupos de oligosacáridos que conforman a estas glicoproteínas,

- I. Grupo rico en residuos de manosas: Este grupo contiene una manosa y N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas al núcleo heptasacárido común.
- II. Grupo complejo: Este grupo contiene un residuo de fructuosa unida a la terminal N-acetilglucosamina y la cadena exterior, casi siempre contiene el trisacárido N-acetilglucosamina-galactosa-ácido siálico.
- III. Grupo híbrido: Este grupo presenta combinaciones de los dos grupos anteriores.

La gonadotropina coriónica presenta un patrón de oligosacáridos menos heterogéneo, ya que sólo presenta estructuras bi-ramificadas, y residuos terminales de galactosa-ácido siálico (Baenziger, 1996; Hearn and Gomme, 2000).

El papel de estos carbohidratos es fundamental ya que juegan un rol importante; en las gonadotropinas, las cadenas de oligosacáridos representan alrededor del 30% de la masa total de la hormona (Day y Van Roey, 2001), se ha demostrado que los oligosacáridos añadidos desempeñan un papel en la determinación del mantenimiento del plegamiento de las proteínas, en el ensamblaje de la subunidad, en la conformación y secreción del heterodímero maduro y en la tasa de depuración metabólica y transducción de señales (Fiete et al, 1991; Ulloa-Aguirre et al, 1999). La tasa de depuración metabólico y de la potencia biológica in vivo de las gonadotropinas dependen del tipo específico de los residuos terminales en sus estructuras de oligosacáridos (Fiete et al, 1991; Baenzinger et al, 1992; Stockell-Hartree y Renwick, 1992; Manzella et al, 1995; Burgon et al, 1996; Moore et al, 2000). Por ejemplo, la vida media en circulación de la FSH y la hCG se ve directamente afectado por la presencia o ausencia de ácido siálico (Morell et al., 1971), sin embargo, en estudios realizados in vitro la respuesta biológica no se modifica (Ulloa-Aguirre et al, 1988; Fares, 1992).

La subunidad alfa de todas las glicoproteínas de los animales vertebrados contiene dos cadenas de carbohidratos, las cuales presentan uniones tipo N en residuos de Asparagina. Sin embargo la subunidad beta contiene sólo una o dos cadenas de carbohidratos con este tipo de unión (Hearn and Gomme, 2000)

Específicamente la subunidad  $\beta$  de la LH equina y la gonadotropina coriónica equina contienen por lo menos 4 moléculas de carbohidratos que poseen uniones tipo O en residuos de serina/treonina (Baenziger and Green, 1988)

Las cadenas de carbohidratos con uniones tipo N (Asn) unido a las hormonas glicoproteicas muestran características diferentes en el peso y carga, y por tanto las hormonas glicoproteicas contienen múltiples isoformas, las cuales han podido ser separadas mediante su carga eléctrica por medio de técnicas como isoelectroenfoque. (Hearn and Gomme, 2000)

#### 4.3.2 Actividad biológica

La gonadotropina coriónica equina tiene afinidad por el mismo receptor que la eLH y por lo cual este es denominado eLH/eCG, dicho receptor se trata de un receptor transmembranal heptacatenario unido a proteínas G.

El ácido siálico al estar presente en más del 10% de su masa molecular, le confiere a la eCG una carga negativa. Esta carga tiene un efecto repulsivo en la afinidad de la eCG a su receptor, dando así, una menor afinidad por el receptor en comparación a la unión que tiene la eLH a dicho receptor.

La función de la gonadotropina coriónica equina además de participar en la manutención de las estructuras lúteas a partir del día 35, inducir la formación de cuerpos lúteos suplementarios (secundarios y accesorios) y estimular al cuerpo lúteo primario entre los días 35 a 80 de la gestación, contribuye o influye en la esteroidogénesis del cuerpo lúteo primario (Daels et al, 1998)

#### 4.3.3 Regulación y secreción de la CG

El patrón de secreción de esta hormona es de forma constitutiva ya que las copas endometriales no poseen gránulos de almacenamiento temporal.

En la actualidad se desconocen los factores que regulan la secreción de la gonadotropina coriónica, pero se ha informado que el Factor de Crecimiento Epidermal interviene en regulación de la síntesis de la subunidad alfa de todas las glicoproteínas a través de cinasas de proteínas C (PKC). Se sabe además, que este factor se encuentra en el corioalantoides desde el día 30 de la gestación hasta el 150 coincidiendo precisamente con el periodo de secreción de esta hormona.

Hay factores que de manera indirecta influyen en las concentraciones de eCG en la circulación materna. Estos incluyen el tamaño de la yegua (Cole 1938; Day y Rowlands 1940, Allen et al. 2002), yeguas múltiparas (Day y Rowlands 1947; Murphy et al. 1985), la variabilidad intrínseca de la yegua (Manning et al. 1987; Martinuk et al. 1990), la paternidad (Manning et al. 1987), el genotipo fetal (Bielansky et al 1956., Clegg et al. 1962; Allen, 1969b, Allen, 1975), el sexo del feto (Mönke y Franz, 1985), el embarazo gemelar (Rowlands 1949), el grado de

plegamiento del endometrio en el cuerno del útero grávido en el momento de la invasión de la faja coriónica, el medio ambiente uterino (Allen et al. 1993), el tamaño corporal de la madre y la alimentación (Wilsher y Allen, 2011)

Cuando hay muerte fetal después de haberse formado las copas endometriales, la secreción de eCG sigue siendo normal debido a que la función de las copas endometriales no se ve alterada.

#### 4.3.4 Mecanismo de acción

Las hormonas glicoproteicas, al ser miembros de la superfamilia de receptores unidos a proteína G, muestran su respuesta fisiológica al interactuar con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana plasmática de la célula blanco (Dufau, 1998). El receptor se encuentra conformado en tres regiones distintas, un dominio extracelular estructurado por 340 a 390 residuos de aminoácidos, una segunda región que se forma por una serie de siete regiones transmembranales hidrofóbicas y un dominio intracelular de 50 residuos de aminoácidos.

La interacción de la hormona con su receptor, conduce a la formación del complejo hormona-receptor, quien induce la activación de un segundo mensajero: adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o bien fosfatidilinositol o PIP<sub>2</sub>. Una vez unido al receptor, las hormonas glicoproteicas pueden activar a más de un segundo mensajero. En el caso de los receptores de LH/CG pueden activar al AMPC y PIP<sub>2</sub>. Se ha demostrado que en células lúteas la unión al receptor resulta en la activación de fosfolipasa-C con un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca<sub>2</sub>. (Corda *et al.*, 1985; Gudermann *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1987)

El mecanismo de acción de esta hormona es que al activar al receptor, el cual está unido a la proteína G, activa a un segundo mensajero que en este caso es el adenosín monofosfato-cíclico (AMPC).

## 4.4 FISIOLÓGÍA DE LA GESTACION TEMPRANA

### 4.4.1 Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es una estructura formada por fibroblastos, células inmunes, células endoteliales y células de origen sanguíneo. Además presenta células lúteas derivadas de las células de la granulosa y de la teca (Niswender et al, 2000). Tiene como función la síntesis y secreción de progesterona para mantener la gestación durante los primeros 180 días. Esta estructura mantiene su función gracias al estímulo por parte de la LH y de la eCG así como de la  $\text{PGF}_2\alpha$  y al factor de crecimiento endotelial.

#### 4.4.1.1 Desarrollo del cuerpo lúteo

Una vez que se lleva a cabo el fenómeno de la ovulación, con la ruptura del folículo y la consiguiente liberación del ovocito y líquido folicular, las células que originalmente rodean a este folículo, células de la granulosa y de la teca, se deben integrar dentro de él para formar el llamado cuerpo lúteo. Estas células sufren un cambio estructural llamado luteinización el cual es estimulado por la LH. La luteinización de estas células permite que haya una síntesis y secreción de progesterona cuya función es mantener la gestación. En el caso específico de la especie equina las células de la teca sufren una atresia mientras que las células de la granulosa son convertidas a células lúteas grandes, que son las principales secretoras de progesterona en esta especie. (Niswender et al, 2000).

#### 4.4.1.2 Cuerpo lúteo primario

El cuerpo lúteo primario es una estructura que se forma con la ovulación acompañada de signos de estro. Dicha estructura no es destruida por la acción de Prostaglandina  $\text{F}_2\alpha$  en el día 14 a 16 (Blanchard et al, 2003) debido a la existencia de un embrión fertilizado, que es quién lleva a cabo el reconocimiento materno de la gestación. Este cuerpo lúteo es mantenido gracias a la acción de la hormona luteinizante (LH) (Gigli et al, 2006).

#### 4.4.1.3. Vida media del cuerpo lúteo primario

El cuerpo lúteo primario es el responsable de mantener la gestación durante los primeros 40 a 50 días a través de la secreción de progestágenos. Esta secreción continúa hasta el día 120 – 150, momento en el cual este cuerpo lúteo desaparece.

A partir del día 35 de la gestación con la secreción de eCG se da el resurgimiento del cuerpo lúteo primario (Ginther et al, 1998), donde ocurre un aumento en el diámetro del CL así como en la secreción de progestágenos, por lo que se sugiere que esta hormona es capaz de estimular la esteroidogénesis del cuerpo lúteo primario (Daels et al, 1998).

#### 4.4.1.4. Cuerpos lúteos suplementarios

Durante los días 40 a 150 de la gestación equina se desarrollan cuerpos lúteos suplementarios. Estos cuerpos lúteos se han clasificado de la siguiente manera: los cuerpos lúteos producto de folículos que llegan a ovular se les conoce como secundarios, mientras que los cuerpos lúteos producto de folículos que no ovulan y que sólo se luteinizan se les conocen como accesorios.

En la yegua gestante la hormona responsable de la estimulación del desarrollo folicular para la formación de cuerpos lúteos suplementarios es la FSH hipofisiaria, la cual es liberada en forma rítmica cada 10 a 12 días, sin importar que la yegua se encuentre gestante (Allen, 1982). Por tanto la FSH es la encargada del desarrollo folicular, mientras que la eCG secretada a partir del día 35 de la gestación es la encargada del desarrollo final y de la ovulación de estos folículos maduros.

Los tres primeros meses de la gestación equina se mantiene por la progesterona secretada por el cuerpo lúteo primarios, el cual es la fuente principal de progestágenos en los primeros 50 días de la gestación, y que continúa contribuyendo hasta su desaparición entre los días 120 a 150 de la misma.

Entre los días 45 y 50 de la gestación, se forman los cuerpos lúteos secundarios resultantes de ovulaciones dando un aporte adicional de progesterona. Después del día 160 de la gestación, tanto el cuerpo lúteo primario

como los cuerpos lúteos suplementarios sufren una regresión, dando paso al mantenimiento de la gestación a través de la unidad feto-placentaria

#### 4.4.1.5. Síntesis y secreción de progesterona

El pico preovulatorio de LH además de inducir la ovulación ayuda a la diferenciación de las células foliculares residuales para la formación del cuerpo lúteo y empezar a producir progesterona a concentraciones elevadas. Antes de esto, el estradiol es el principal esteroide secretado por el ovario. Las células de la granulosa y las células de la teca del folículo en forma coordinada producen estrógenos; las células de la teca expresan enzimas para convertir el colesterol a andrógenos, pero carecen de las enzimas necesarias para convertir los andrógenos en estradiol (Bao y Garverick, 1998). Por el contrario, las células de la granulosa producen progesterona, pero no pueden convertir pregnenolona y progesterona a andrógenos. Sin embargo, las células de la granulosa pueden convertir los andrógenos en estradiol. Así, los andrógenos tecales son aromatizados a estradiol por las células granulosa. El estradiol es importante como un mitógeno y estimula la división de las células granulosa. Las concentraciones preovulatorias de LH durante la luteinización de las células de la teca y granulosa alteran la vía esteroidogénica por lo que la progesterona es la principal hormona esteroide producida por cada uno de estos tipos de células después de la luteinización.

El sustrato para la esteroidogénesis es el colesterol, en condiciones normales, la mayor parte del colesterol se sintetiza en el hígado (Krisans, 1996) y se transporta a los tejidos, tales como la corteza suprarrenal, el folículo, el cuerpo lúteo, y los testículos en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas lipoproteínas son las fuentes más comunes de colesterol para la producción de las hormonas esteroides por el cuerpo lúteo (Hwang y Menon, 1983; Pate and Condon, 1989). En ciertas condiciones, las células lúteas son capaces de sintetizar colesterol a partir de acetato (Cook et al, 1967; Cook y Nalbandov, 1968), sin embargo, bajo condiciones normales, la mayor parte del colesterol utilizado en la esteroidogénesis se obtiene de la sangre en la forma de

LDL o colesterol HDL. La captación de LDL por las células lúteas ocurre por endocitosis. Una vez interiorizados, los endosomas se combinan con los lisosomas, donde disocian al receptor de la LDL y el colesterol libre queda disponible en la célula. El receptor de LDL se recicla o se degrada. La captación de HDL extracelular se produce después de unirse a una membrana plasmática de una proteína siendo el colesterol transportado en la célula por un mecanismo no definido que no parece ser endocitosis mediada por receptores. Una vez que el colesterol queda libre en el citosol de la célula, éste puede ser utilizado para la esteroidogénesis o la formación de membranas celulares, o puede ser esterificados con ácidos grasos para formar ésteres de colesterol que serán almacenados en forma de gotas de lípidos. El colesterol cuando se encuentra en forma de ésteres es hidrolizado por la colesterol esterasa, quien es activada cuando es fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) (segundo mensajero). La síntesis de esteroides depende del transporte del colesterol a la mitocondria y después de la membrana externa mitocondrial a la interna, donde la cadena lateral del colesterol es cortada por un complejo enzimático para formar la pregnenolona. El primer paso en este proceso que es el transporte de la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna se lleva a cabo mediante la proteína STAR. Una vez transportado a la matriz mitocondrial, la acción de la P-450<sub>scc</sub>, la adrenodoxina y la reductasa adrenodoxina rompen la cadena lateral del colesterol formando pregnenolona. La Pregnenolona es transportada al retículo endoplásmico liso, que está estrechamente asociado a las mitocondrias, donde la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) convierte a la pregnenolona en progesterona. La progesterona entonces se difunde ya que no hay evidencia de que la progesterona pueda ser almacenada en grandes cantidades en el tejido lúteo.

Las concentraciones de progesterona en el suero dependen de la cantidad de flujo sanguíneo que irrigue los tejidos esteroidogénicos, y la capacidad de estos tejidos para sintetizar progesterona. La cantidad de tejido esteroidogénico depende a su vez tanto en el número, como en tamaño de células lúteas. El flujo de sangre hacia el cuerpo lúteo aumenta a medida que las concentraciones de



progesterona sérica aumentan, además, el aumento en dichas concentraciones en suero es asociada también con los cambios en las concentraciones del mRNA que codifica para las principales proteínas esteroideogénicas: STAR, P-450scc y 3 $\beta$ -HSD durante la fase lútea

La secreción de progesterona en el equino comienza a elevarse entre las 10 a 12 horas post-ovulación aumentando a niveles mayores a 1ng/ml de suero llegando a niveles máximos alrededor del día 10 del diestro ( $22.3 \pm 7.3$ ng/ml). Para el día 14 hay una reducción drástica por efecto de la liberación de prostaglandinas que lisan al cuerpo lúteo. Si la yegua queda gestante, las concentraciones de progesterona disminuyen ligeramente hasta antes del día 19 de la gestación, volviéndose a elevar alrededor del día 30 – 42 de la gestación con la formación de los primeros cuerpos lúteos suplementarios. La progesterona se incrementa conforme aumentan el número de cuerpos lúteos suplementarios, por lo que alcanza su máxima concentración entre el tercero y cuarto mes de gestación

La síntesis de progesterona se puede dar a partir de tres diferentes fuentes, en la cual el substrato común es una molécula de colesterol; estas fuentes pueden ser a partir de lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad o mediante la hidrólisis del colesterol a través de la enzima colesterol esterasa. El colesterol libre es transportado hacia la mitocondria, ahí la proteína STAR lo envuelve para ser convertido en pregnenolona mediante la citocromo P450

#### 4.4.2. Reconocimiento de la gestación

El embrión equino tarda aproximadamente 144 – 168hr post-ovulación en recorrer todo el oviducto entrando al útero a través de la papila utero-tubárica entre los días 6 a 7 de la gestación, gracias a que el embrión secreta prostaglandina  $E_2$  y  $F_2\alpha$  al alcanzar el estadio de mórula en el día 5 de la gestación. Gracias a estas hormonas que actúan localmente sobre el músculo liso, específicamente en las fibras musculares circulares de la pared del oviducto permiten que el embrión se mueva hacia adelante, con la ayuda de los cilios para entrar en el útero aproximadamente 24 horas más tarde. Durante los días 6 al 23 el embrión se ve envuelto en una capa conocida como cápsula equina, la cual lo

protege para moverse libremente dentro del lumen uterino impulsado por contracciones peristálticas del miometrio. Además de proporcionar fuerza y elasticidad al blastocito en expansión para que pueda soportar los rigores de las contracciones del miometrio que lo impulsan a través del útero, la cápsula es claramente importante en la acumulación y regulación en el suministro de nutrientes. El material que conforma a la capsula es secretado por células trofoblásticas alrededor del día 6 de la gestación. Esta cápsula es el resultado de la eliminación física de la zona pelúcida que se ha logrado observar con la ayuda de un micromanipulador utilizado horas antes de la eclosión y que revela una cápsula que se ha plegado y doblado sobre sí misma y que se desarrolla y se expande rápidamente. Este proceso es necesario para dar cabida a la rápida expansión del blastocito que se produce durante los 2 o 3 días después de que a través de mecanismos físico-químicos hacen una abertura en la zona pelúcida que permiten una secreción exocrina para coagular y endurecer una serie de "pliegues", pero al mismo tiempo crear una capa contigua que puede envolver por completo el embrión en su interior. Como ya se mencionó en el párrafo anterior, la cápsula equina tiene por función la regulación e incorporación de nutrientes, entre los cuales se puede describir, la incorporación de uno de los componentes de la leche uterina, la proteína llamada P19. Este componente posee un peso de 19kDa y se ha identificado como miembro de la familia lipocalina, las cuales son proteínas transportadoras de minerales y/o vitaminas (Stewart et al., 1991)

El movimiento que realiza el embrión durante esta etapa es una parte integral de una adaptación evolutiva para asegurar que el embrión envíe la señal necesaria para que se lleve a cabo el reconocimiento materno de la gestación, el cual se desarrolla entre los días 14 a 16 post-ovulación suprimiendo el reciclaje de receptores para oxitocina en el endometrio e inhibiendo el patrón pulsátil de prostaglandina  $F_2\alpha$  (Watson et al, 1997). A esto se le llama factor antiluteolítico de la gestación. A diferencia de los rumiantes, el embrión equino no produce moléculas proteicas con propiedades lúteo-estáticas, sin embargo, se sabe que el embrión equino comienza a secretar cantidades apreciables de estrógenos a partir del día 10 post-ovulación (Heap et al., 1982). Experimentos recientes han

establecido de manera convincente que, como en los rumiantes, la supresión de la regulación cíclica normal de receptores a oxitocina en el endometrio entre los días 10 y 16 después de la ovulación es una parte integral del mecanismo lúteo estático en la yegua preñada.

Las concentraciones endometriales de receptores para oxitocina se reducen en gran medida en las yeguas preñadas entre los días 10 y 16 y el pico normal en la liberación de PGF<sub>2a</sub> en el endometrio, medida en el plasma como 13,14 dihidro-15-ceto PGF<sub>2a</sub> (PGFM), que se produce en respuesta a una dosis por vía intravenosa (IV) de oxitocina entre los días 10 y 16 después de la ovulación en la yegua son eliminados durante el mismo periodo gestación, es de interés recordar que la oxitocina participa en el establecimiento de esta retroalimentación positiva a PGF<sub>2</sub> para inducir luteólisis en la yegua cíclica es, como en el cerdo, secretada por el endometrio (Stout et al., 2000)

El embrión equino, además posee la capacidad para secretar apreciables volúmenes de PGF<sub>2a</sub> y PGE<sub>2</sub> cuando se cultivan en in vitro (Stout y Allen, 1996), lo cual se hace suponer que estimula a nivel local las contracciones peristálticas y las relajaciones del miometrio necesarias para propulsar el embrión a través del lumen uterino durante el período del reconocimiento materno de la gestación. Esta hipótesis está respaldada por el reciente hallazgo de Stout y Allen que la movilidad es prácticamente abolida cuando la yegua gestante es tratada con inhibidores de la síntesis de prostaglandinas como el meglumine de flumixín (Stout y Allen, 2000)

#### 4.4.2.1. Fijación y orientación

En el día 15 o 16 ocurre la fijación de la vesícula cerca de la bifurcación uterina, la cual es favorecida por el aumento en el diámetro del embrión y por un incremento del tono uterino que provoca una mayor resistencia al movimiento. Una vez fijada la vesícula embrionaria se lleva a cabo la orientación de ésta, la cual se define como la rotación de la vesícula embrionaria hacia el polo donde el embrión se encuentre de cara con el endometrio, es decir, que el embrión se localiza en la zona ventral con respecto al saco vitelino. Alrededor del día 20, la cápsula equina se desintegra permitiendo que el embrión desarrolle elongaciones celulares en la

superficie externa de la membrana coriovitelina que se proyectan hacia el interior de las glándulas endometriales para adherir físicamente al embrión en el endometrio (Allen, 2001).

#### 4.4.2.2. Rescate del CL primario

Aunque el cuerpo lúteo permanece dentro de los ovarios, éste declina su actividad durante los días 17 a 30 días de gestación por lo cual la concentración de progesterona disminuye casi hasta 5ng/ml en el día 35 de la gestación. Entre los días 25 a 30 de la gestación se lleva a cabo la formación de las copas endometriales a partir de las células trofoblásticas del cinturón coriónico que se forma en la unión del saco vitelino y del saco alantoideo (Ginther, 1998). Estas copas son las encargadas de secretar la hormona gonadotropina coriónica equina, la cual se encuentra en la circulación materna desde el día 40 de la gestación.

Una vez que se inicia la secreción de esta hormona, el cuerpo lúteo primario aumenta de tamaño y por ende la producción de progestágenos (Allen, 2000) a lo que se le conoce como resurgimiento del cuerpo lúteo primario

#### 4.4.2.3. Placentación equina

Tanto el embrión burro como el embrión caballo secretan estrógenos desde el día 5 - 6 de la gestación; esta secreción se lleva a cabo en saco vitelino, corioalantoides y cinturón coriónico en la misma proporción, mientras que en el caballo la mayor producción de estos estrógenos se lleva a cabo en el cinturón y en menor proporción en el corioalantoides (Heap et al, 1991).

#### 4.4.2.4 Desarrollo de membranas

La cápsula equina comienza a desintegrarse alrededor del día 20-21, como consecuencia de enzimas segregadas por el trofoblasto y / o epitelio de la luz del endometrio. Durante este período, el embrión se hace más claramente visible en un polo de la vesícula embrionaria. La organogénesis se desarrolla rápidamente y el corazón embrionario primitivo ya está bombeando sangre a través de la arteria vitelina al seno terminalis, y por la gran cantidad vasos minúsculos en desarrollo

del mesodermo corre sangre hacia los tejidos de las membranas. La membrana alantoidea aparece como una evaginación del intestino grueso del embrión alrededor del día 21, y crece con rapidez para rodear al embrión y fusionarse con el corion para formar el alantocorión que con el tiempo se convertirá en la placenta. Para el día 25 el alantocorión constituye aproximadamente una cuarta parte del volumen total del embrión y, sobre los 15-20 días siguientes, se continúa ampliando rápidamente para sustituir completamente al saco vitelino por el día 45. (Allen, 1975). El mesodermo vascularizado continúa agrandándose, hasta que, para el día 33 a 35 abarca todo el embrión, sin embargo un pequeño círculo de tejido bilaminar persiste en los senos terminales cerca del polo anembrionario. Este agrandamiento simultáneo del alantoides por encima del embrión, y la regresión del saco vitelino por debajo de él, da la ilusión óptica de que, entre los días de 23 y 40, el embrión migra de un polo al otro, cuando en realidad, es el polo el que se mueve. En la figura 6 se esquematiza el desarrollo de las membranas embrionarias equinas a diferentes días de gestación.

En el 70 – 80% de los embriones equinos, la implantación se lleva a cabo entre el día 25 – 30 de la gestación, completándose la implantación alrededor del día 100 de la gestación. Estudios desarrollados por Lennard y colaboradores (1995) sugieren que el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) juega un papel importante durante la implantación. Como se había mencionado con anterioridad, el EGF se encuentra en el endometrio desde el día 30 de la gestación, para el día 38 comienza a expresarse en el epitelio de las glándulas endometriales. Además se han observado receptores para EGF tanto en el alantocorion durante los días 30 – 34 y 150 – 250 de la gestación

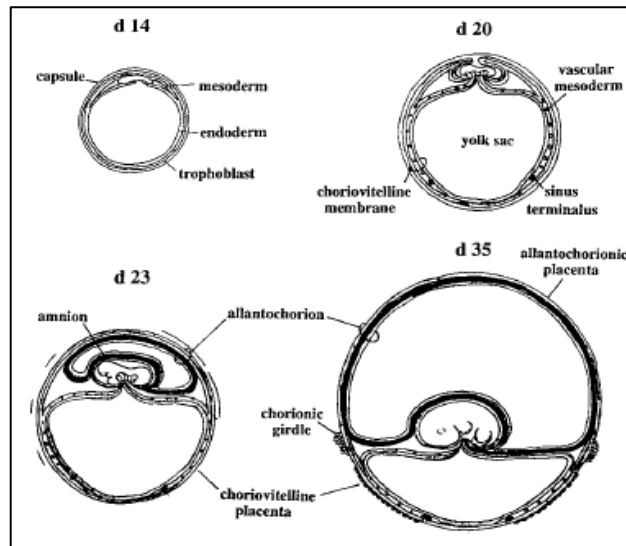


Figura 6. Representación esquemática del desarrollo y diferenciación de las membranas embrionarias equinas entre los días 14 a 35 de la gestación. Adaptado de Allen et al., 1975

La formación de las microvellosidades se lleva a cabo tanto del lado materno como del lado fetal como producto de la interacción entre las células del endometrio y las células no invasivas del corioalantoides, que para el día 60 de la gestación han formado una ramificación. Para el día 120 de la gestación se forman microplacentomas en toda la superficie de la placenta (microcarúnculas del lado materno y microcotiledones del lado fetal). Estos microplacentomas permiten el intercambio gaseoso, de nutrientes y desechos entre la circulación materna y la circulación fetal.

Las glándulas endometriales permanecen funcionales durante toda la gestación equina, que en el caballo es de 431 días y en el burro es de 360-370 días, liberando sus secreciones ricas en proteínas

#### 4.4.3. COPAS ENDOMETRIALES

##### 4.4.3.1. Formación y desarrollo de las copas endometriales

Una característica única de la embriogénesis equina es el desarrollo del cinturón coriónico en la superficie externa del corion entre los días 25 y 35 después de la ovulación y su posterior invasión del endometrio materno entre los días 36 y 38

para formar las copas endometriales, las cuales tienen la función de secretar gonadotropina coriónica equina. El cinturón es visible alrededor del día 25 como una serie de ondulaciones de poca profundidad en el corion que en los próximos 10 días forman pliegues con vellosidades en respuesta a la hiperplasia que sufren las células del trofoblasto en la parte superior de cada pliegue. La superficie del cinturón comienza a liberar una secreción que se adhiere a la superficie luminal del endometrio. Luego, en torno al día 36, las células binucleadas comienzan a invadir el tejido materno (Allen et al, 2000), este cinturón es más grueso y mejor desarrollado en su extremo próximo a la alantocorion y muestra un adelgazamiento en el extremo adyacente a la membrana coriovitelina.

Los estudios realizados sobre las capacidades del factor de crecimiento encontrado en las membranas del embrión caballo han concluido ser una fuente importante de crecimiento mitogénico para estimular la multiplicación de las células del trofoblasto y el alantoides

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una hormona secretada por las copas endometriales que son tejidos de origen fetal, esta hormona parece ser necesario para el establecimiento y mantenimiento de la gestación equina normal.

Alrededor del día 27 días post-ovulación, se forma una banda avascular de células trofoblásticas que se desarrolla en la superficie de la vesícula embrionaria en la región ecuatorial exactamente en el punto de unión del saco vitelino en regresión y las membranas alantoideas en desarrollo (Ginther, 1998). Esta faja se compone inicialmente de epitelio trofoblástico con pliegues corrugados en donde las células proliferan. Los pliegues se presan contra el epitelio uterino por la expansión de la concepción. Las células de los ápices de los pliegues son células binucleadas que comienzan a invadir el endometrio en los días 35-37(Allen et al., 1975).

En la formación de las copas endometriales se pueden mencionar tres eventos importantes: la invasión de las células de origen trofoblástico, la migración de éstas hacia el endometrio materno y la proliferación para la formación de dichas copas (Enders et al, 1996)

El cinturón coriónico se encuentra formado por células binucleadas que crecen y se multiplican entre los días 36 a 38 de la gestación. Estas células mediante un movimiento ameboideo se desprenden e invaden el endometrio. Al insertarse dentro del endometrio, estas células forman lo que conocemos como copas endometriales, que posteriormente alrededor del día 40 comenzarán a secretar eCG hasta el día 100 – 120 de la gestación en la yegua.

Las células trofoblásticas tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular por medio de la acción de metaloproteinasas. Hacia el día 36 de la gestación dichas células logran migrar hacia el tejido intersticial del endometrio donde complementan su diferenciación. En ese sitio crecen y se adhieren entre sí para formar las copas endometriales (Hamilton et al, 1973).

Las copas endometriales se desarrollan en el cuerno gestante del útero, macroscópicamente son de estructura plana y circular; su tamaño varía desde 2mm hasta 5cm de ancho. Su tamaño y forma dependen de la conformación del endometrio y de la genética de los padres.

#### 4.4.3.2. Destrucción de las copas endometriales

Las copas endometriales al estar formadas por células de origen embrionario con parte de su información genética diferente a la de la madre, lo cual provoca desde el inicio una respuesta de tipo inflamatoria. Las células invasoras de origen paterno expresan el Antígeno Mayor de Histocompatibilidad tipo I estimulando una respuesta de tipo humoral y celular en la madre. La respuesta inmune dependerá de la compatibilidad entre el HMC tipo I de la madre y del padre que ha transmitido a su descendencia

Entre los días 36 y 38 de la gestación se presenta un acumulo de linfocitos en el estroma del endometrio. Estos linfocitos desaparecen temporalmente, reapareciendo hacia el día 50 de la gestación incrementando en número.

Conforme avanzan los días de la gestación comienzan a acumularse linfocitos B, eosinófilos y células plasmáticas en el estroma del endometrio. Entre el día 70 a 80 de la gestación las células que forman a las copas comienzan a degenerarse debido a la acción de linfocitos T, seguido de una infiltración de linfocitos B,



macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos en el tejido endometrial que rodea a cada copa, produciéndose una reacción inmune celular acompañada de anticuerpos citotóxicos que están dirigidos hacia los antígenos paternos del CMH tipo I. Dicha reacción sólo ocurre a nivel de las copas endometriales por lo que la gestación no se ve comprometida, debido a que el trofoblasto no expresa sus Antígenos de Histocompatibilidad tipo I y II

En las gestaciones donde el embrión es equino (yegua con caballo) las copas endometriales se desintegran entre los días 120 a 150 de la gestación han desaparecido (Stewart et al 1995). A partir del día 60 comienza a existir citólisis y fagocitosis y parte del material necrótico de las copas se deposita en la superficie de éstas formando en algunas áreas sacos necróticos llamados bolsas coriónicas (Murphy y Martinuk, 1991).

#### 4.4.3.3. Secreción y papel de la gonadotropina coriónica equina

Estudios de inmunomarcaje ultraestructural indican que la síntesis y secreción de eCG comienzan a partir del día 32, antes de migrar a través del epitelio de la madre. Los racimos de las células binucleadas penetran profundamente en el endometrio; estas células tienen un citoplasma lleno de mitocondrias, además de cisternas del retículo endoplásmico rugoso y un gran aparato de Golgi. Además poseen una fuerte inmunoreactividad para la glucosa transportadora de una isoforma de su plasmalema. La Inmunocitoquímica también demuestra que la eCG se localiza en las cisternas de Golgi, y en pequeños gránulos densos similares a los encontrados en la celda de la migración del cinturón coriónico presentes tanto en la región de Golgi como en el plasmalema, por lo tanto, la liberación de eCG, parece llevarse a cabo por medio de un mecanismo de exocitosis. El pequeño tamaño y la ausencia de una acumulación significativa de eCG en gránulos se encuentran en marcado contraste con la hormona luteinizante, (ELH), donde la hipófisis equina contiene numerosos gránulos grandes en el gonadotropos. Estos indicadores sugieren que la morfología de la célula de la copa secreta constitutivamente eCG (es decir, de forma continua), sin

necesidad de gránulos de secreción, mientras que en la celda de la hipófisis se utiliza una vía regulada en la secreción de eLH. (Wooding et al, 2001)

La cantidad de eCG secretada durante la gestación equina es elevada y es probablemente parte importante del diálogo feto-materno para el desarrollo de una gestación exitosa (Stewart y Allen, 1995).

Esta hormona se encuentra en el suero de la yegua gestante desde el día 30 y sus niveles se elevan a partir del día 45 de la gestación (Daels et al., 1995). Wooding y colaboradores en el 2001 señalan que la secreción de gonadotropina coriónica equina (eCG) por las células del cinturón coriónico se inicia desde el día 32 post-ovulación posiblemente como consecuencia de las células binucleadas. Esto produce una secreción y acumulación local considerable de eCG entre el epitelio uterino y dicho cinturón antes de que comience la invasión de células hacia el endometrio.

Los altos niveles de eCG extracelular demostrado en las últimas etapas de la formación del cinturón puede ser un elemento esencial como requisito previo para la invasión de células provenientes del cinturón y la formación de la copa endometrial. Estudios anteriores han demostrado que en gestaciones donde el desarrollo del cinturón es pequeño es probable que la gestación no tenga éxito (Allen et al., 1993). Esto sugiere que se requiere un nivel mínimo de eCG a nivel local como un componente importante de en el desarrollo del diálogo materno-fetal. La vida activa de la copa depende de los linfocitos maternos concentrados en el borde de la misma (Allen, 1982), lo que sugiere una vez más que la supervivencia del tejido fetal en el endometrio puede ser dependiente a la capacidad de secreción de grandes cantidades de eCG para mantener la función de dichas copas

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Localización y Animales Experimentales**

El trabajo de campo se realizó en el Rancho San Francisco, antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG) perteneciente a la FMVZ, ubicado en el km 2.5 de la carretera Chalco- Mixquic en Chalco, Estado de México.

#### **5.1.1. Hembras**

Se utilizaron 8 yeguas criollas clínicamente sanas de entre 5 y 10 años de edad y 9 burras criollas de entre 2 y 6 años de edad, con una condición corporal entre 2 y 2.5 en una escala de 0 a 5 (Martín y Rosset, 1993). Previo al desarrollo del estudio y como parte del calendario de medicina preventiva, cada hembra se desparasitó con Ivermectina (Eqvalan, Bayer México®) aplicando una dosis de 2.5µg/kg de peso. Posteriormente se les realizó una evaluación del aparato reproductor con el fin de asegurar que que no presentaran alguna alteración.

#### **5.1.2. Machos**

Se utilizó un semental equino criollo de 10 años y un burro de la raza Kentucky de 12 años de edad, diagnosticados clínicamente sanos y con una condición corporal de 3 (Martín y Rosset, 1993).

#### **5.1.3. Alimentación**

Todos los animales recibieron una alimentación que consistió de heno de avena, alfalfa achicalada y agua ad-libitum, además se mantuvieron en corrales con templetes para sombra. Una vez diagnosticadas las hembras gestantes, se suplementaron con concentrado comercial que contenía un 12% de proteína.

#### 5.1.4. Inseminación

A las hembras seleccionadas, se les realizó tres veces por semana el seguimiento del desarrollo folicular con el fin de establecer el momento adecuado para la inseminación (Ginther 0. J, et al, 1995). Para este proceso, se utilizó un ultrasonido marca Chison 560<sup>®</sup> de tiempo real, equipado con un transductor lineal de 5mhz. Todas las hembras fueron inseminadas artificialmente con semen fresco de su propia especie, para lo cual previamente se colectó semen de los sementales por medio de una vagina artificial modelo Missouri. La inseminación se realizó en el momento en que las hembras presentaban un folículo pre-ovulatorio de forma periforme y con un diámetro igual o mayor a 35mm (Ginther 0. J, et al, 1995), esto se hizo con una pipeta de inseminación profunda utilizando semen fresco a una dosis de 250 millones de espermatozoides/ml (Boeta y Zarco, 2005). Este procedimiento se realizó cada 48 horas o bien hasta que ocurriera la ovulación, dicho evento se confirmó por medio de ultrasonografía (Ginther 0. J, et al, 1995).

#### 5.1.5. Diagnóstico de gestación

Se realizó a los 15 días post-ovulación, mediante ultrasonografía, se localizaba la vesícula embrionaria cerca de la bifurcación uterina, y a partir del día 22 se evaluó la viabilidad fetal a través de la presencia del latido cardíaco, movimiento fetal o pulsaciones del cordón umbilical (Ball, 1987; Ginther, 1998).

#### 5.2. Actividad ovárica

A partir del día 33 y hasta el día 120 de la gestación se realizó el seguimiento de la actividad ovárica tres veces por semana mediante ultrasonografía para revisar el cuerpo lúteo primario así como también se determinó el momento de aparición de los cuerpos lúteos suplementarios considerando el diámetro de estos.

### 5.2.1. Recolección de muestras sanguíneas:

A la par de la revisión ultrasonográfica para determinar la actividad ovárica, se colectaron muestras sanguíneas por punción de la vena yugular con tubos Vacutainer sin anticoagulante. El suero se obtuvo de estas muestras por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, conservándose a -20°C hasta su análisis en el laboratorio.

### 5.2.2. Determinación hormonal

#### 5.2.2.1. Progesterona

Se determinaron las concentraciones séricas de progesterona en un solo ensayo mediante el uso de un estuche comercial para radioinmunoanálisis de fase sólida (Coat-a-Count® Progesterone, Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. Camberley, UK). Con un coeficiente de variación intraensayo del 4.1%

#### 5.2.2.2. Gonadotropina coriónica

Como primer paso, se determinó la concentración de eCG en cada una de las muestras de suero colectadas con la finalidad de elegir aquellas con mayor concentración de la hormona. Posteriormente en cada paso de extracción y purificación fue monitoreada la inmunoreactividad a eCG. Todas estas determinaciones se realizaron mediante un sistema comercial de ensayo inmunoenzimático en placas de micro-titulación (EIA-1298 PMSG, ELISA that Perform, DRG Instruments GmbH, Germany). Con un coeficiente de variación intraensayo del 0.73%

### 5.3. Extracción y purificación de eCG (estandarización del procedimiento)

#### 5.3.1 Preparación de la muestra

Una vez identificadas las muestras con mayor concentración de eCG en el grupo experimental de yeguas, se realizó un pool utilizando solo aquellas muestras con la mayor concentración de eCG.

El pool obtenido fue purificado mediante diálisis contra agua desionizada a 4°C y con agitación constante, con intercambios del agua de diálisis cada 8 horas. Al término de la diálisis, la mezcla de sueros se fraccionó en alícuotas de aproximadamente 25ml en frascos para liofilización (Labcono 5). La liofilización se hizo por 24 horas, al término de las cuales la muestra fue conservada a -20°C hasta el momento de su posterior utilización

### *5.3.2. Extracción de eCG cruda*

La obtención de la eCG cruda se realizó a 4°C de acuerdo al método descrito por Schams y Papkoff (1972), modificada por Aggarwal (1980). Para ello se reconstituyó 1g de suero dializado y liofilizado en 30 ml de agua desionizada, ajustando a pH 4.0 con ácido acético glacial concentrado y manteniendo en agitación durante 12 h. Al término, la muestra se centrifugó a 12000 g durante 45 min y el precipitado obtenido se descartó, el sobrenadante por su parte se ajustó a pH 7.5 con hidróxido de sodio (1N), agregando después un volumen similar de etanol frío gota a gota con agitación constante. Concluido este proceso, la mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 30 min después de los cuales se procedió a centrifugar la muestra en las mismas condiciones (12 000 g x 45 min). Con este manejo, el precipitado obtenido se designó como PPO-1, el cual se dializó y liofilizó para su análisis posterior. El sobrenadante recuperado se ajustó a pH 4.1 con ácido clorhídrico (1N) e inmediatamente recibió 3 volúmenes de etanol gota a gota. Una vez finalizado este proceso, la mezcla se conservó en reposo durante 24 h, el precipitado formado (designado extracto crudo de eCG) se disolvió en agua desionizada y se sometió a diálisis durante 24 h con cambios de agua cada 8 h. Una vez concluida la diálisis, las muestras se liofilizaron para su conservación hasta su purificación.

### *5.3.3. Purificación de eCG*

Una vez determinada la concentración de proteína por el método de Bradford modificado por Bollag (1996) y la inmunoreactividad de eCG mediante el ELISA comercial en cada fracción de proteína obtenida durante el proceso de extracción,

se procedió a calcular la concentración de eCG mediante ELISA para posteriormente purificar la fracción denominada eCG cruda por presentar la mayor inmunoreactividad para esta proteína.

Para ello se utilizó el método descrito por Perera (2004) que sirve para la purificación de gonadotropinas de rumiantes. En breve, 69 mg de proteína se resuspendieron en 12 ml de amortiguador de acetato de amonio 05 mM, pH 5.1 (amortiguador de corrida) y el material insoluble se descartó por centrifugación a 12000g/30 min/4°C. El sobrenadante se aplicó a una columna (1.5 x 27cms) empacada previamente con una resina de intercambio catiónico (Carboximetil-Sepharosa 6B, Pharmacia, Biotech) y equilibrada con el amortiguador de corrida. La columna se eluyó con un gradiente de acetato de amonio que correspondió a 50 mM, pH5.1, 0.1M, pH 6.8 y 1.0M-Gly 0.1M, pH 9.5, respectivamente. Las proteínas que no eluyeron con este gradiente se obtuvieron después de la aplicación de NaCl 1M. En cada corrida cromatográfica se colectaron fracciones de 2 ml los que se analizaron por espectrofotometría a 280 nm. Concluida cada corrida cromatográfica y analizado su patrón de elución, las fracciones se agruparon y denominaron de acuerdo al amortiguador. Dos picos de proteína presentes con el primer amortiguador (CM-1ab, CM-1cd); uno con el segundo amortiguador (CM-2ab) y uno con el tercer amortiguador (CM-3ab). Una vez agrupadas las fracciones fueron dializadas, liofilizadas y almacenadas a -20°C hasta su análisis para determinar la concentración de eCG.

#### *5.3.4. Heterogeneidad molecular*

La heterogeneidad molecular de la eCG se analizó mediante la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, procedimiento realizado mediante el cromatoenfoco (Perera-Marín et al 2008). Para ello, únicamente se analizó la fracción de proteína obtenida con el tercer amortiguador de la cromatografía de CM-Sepharosa (CM-3ab) por presentar la mayor concentración de eCG (57 UI/mg de proteína) determinada por ELISA.

En breve, 14 mg de proteína se resuspendieron en 2 ml de amortiguador de elución Pharmalyte, 1:45, ajustado a pH 7.0 (Pharmalyte, pH 8-10.5 Pharmacia

Biotech AB©, Uppsala Sweden). Resuspendida la proteína, el volumen total se aplicó a una columna (0.7 X 27 cm) empacada con la resina de intercambio iónico (PBE-118, Pharmacia), equilibrada con 40 volúmenes de trietilamina-HCl 0.025M a pH de 11.0 y conservada a 4°C. Previo a la aplicación de la muestra, se colocaron 3 ml de amortiguador de elución con el fin de evitar la exposición de la muestra a un pH extremo. Eluido el amortiguador de corrida y aplicada la muestra a la columna, se inició la corrida cromatográfica con un flujo de 7 ml/ hora y colección de muestras en un volumen de 2ml. A cada fracción se le midió el pH y cuando éste se estabilizó por más de 10 fracciones a pH 7.0, se procedió al cambio de amortiguador por el de Polybuffer 74® (Pharmacia Biotech AB©, Uppsala Sweden), diluido 1:8 y ajustado a pH de 3.5 con HCl 5N. Nuevamente cuando no se presentó cambio en el pH de las fracciones eluidas se retiró este amortiguador y se aplicó NaCl 1.0 M, con el fin de obtener las fracciones de proteína que no eluyeron con el gradiente de pH. Una vez concluida la corrida cromatográfica y con el fin de conocer el patrón de elución de las proteínas contenidas en la CM-3ab, cada fracción se analizó a 280nm. Con ello, se logró un patrón de ocho fracciones de proteína a diferentes rangos de pH que se identificaron como: Isoforma A (10.6-10.4-10.2), B (9.9-9.5-9.1); C (8.9-8.6-8.1); D (7.9-7.4-6.8); E (6.6-6.4-6.1); F (5.8-5.5-5); G (4.9-4.5-4.1) y H (3.8-3.7-3.5), respectivamente. Después de este análisis y previo a la cuantificación inmunorreactiva por ELISA para eCG, las fracciones obtenidas entre un pH de 11.0 a 7.0 se neutralizaron con 200 µl de una solución Tris-HCl, 1.1M, pH 7.4; mientras que, las fracciones eluidas con el Polybuffer 74 y NaCl (valores de elución entre pH 6.99 a < 3.5) se neutralizaron con 200 µl de Imidazol 1.1M pH 7.0. Una vez neutralizadas cada grupo de proteína, se agruparon de acuerdo al pico de proteína identificado siendo dializadas, liofilizadas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

#### *5.3.5. Extracción y purificación de eCG (lote final)*

Una vez estandarizada la metodología de extracción y purificación de la eCG, se procedió a la obtención del lote final, para ello se procesaron 7.56 g de suero liofilizado provenientes del pool inicial, el cual se resuspendió en 200 ml de agua



desionizada, volumen que se utilizó para el proceso de extracción de la eCG como fue descrito previamente.

Obtenida la fracción de proteína denominada eCG cruda (347 mg de proteína), se procedió a dializarla y liofilizarla. Al termino esta fracción se reconstituyó en 40 ml de agua desionizada, lo que generó un volumen final de 61 ml y debido al volumen y a la alta concentración de proteína presente en la muestra, no fue posible analizar toda la fracción en una sola corrida cromatográfica, por ello, el total de proteína se distribuyó en tres lotes, el lote A en un volumen de 10 ml que contenía una concentración de 57 mg de proteína, el lote B de 21 ml con una concentración de 119 mg de proteína y finalmente el lote C con un volumen de 30 y una concentración de proteína de 171 mg. Cada lote se purificó de forma independiente.

#### *5.4. Extracción y purificación de la gonadotropina coriónica de burra (dCG)*

Para el desarrollo del proceso de obtención y purificación de dCG de burra, se procedió al análisis de la mezcla de sueros de las muestras tomadas desde el día 50 hasta el día 60 de la gestación. Este criterio se debió a que el sistema de detección inmunológica utilizado en este estudio no detectó proteína inmunoreactiva de dCG y que en base a la literatura consultada es en este periodo donde se encontramos concentraciones circulantes de la hormona.

Una vez realizada la mezcla de sueros, se dializaron y liofilizaron como ya se ha descrito (sección 3). Un total de 8.31g de suero liofilizado se utilizó para el desarrollo de la metodología de extracción y purificación de la gonadotropina coriónica de burra de forma idéntica a lo descrito para suero de yegua (sección 3)

#### *5.5. Actividad biológica*

##### *5.5.1. Animales*

Con el fin de determinar la actividad biológica de la eCG de yegua y de burra, se utilizó el bioensayo de incremento del tamaño ovárico en rata (Stellman and Pholey, 1953). Para ello, se utilizaron ratas de la cepa Wistar prepúberes con un peso promedio entre 50 y 70 g, obtenidas de la colonia del Bioterio del Instituto de

Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se sometieron a condiciones controladas de temperatura (24°C), ciclo luz-obscuridad (12L/12O) y tuvieron acceso a agua y alimento *ad-libitum*. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales del IIB-UNAM

### 5.5.2. *Bioensayo*

El bioensayo consistió en distribuir 4 animales por grupo, con peso y edad semejante, a los cuales se les aplicó el tratamiento correspondiente de acuerdo al diseño experimental del bioensayo, en una sola aplicación subcutánea y volumen de 0.5 ml. Sesenta horas después, los animales se colocaron en una cámara cerrada conectada a un tanque de CO<sub>2</sub> para provocar la pérdida de la conciencia por hipoxia, inmediatamente después se obtuvo una muestra sanguínea por vía intracardiaca. Finalmente, para la eutanasia de los animales se utilizó la misma cámara hasta provocar la muerte por colapso pulmonar.

### 5.5.3. *Muestras biológicas de las ratas usadas en el bioensayo*

5.5.3.1. Suero: Una vez obtenidas las muestras sanguíneas se centrifugaron a 1500g durante 10 min a 4°C y el suero obtenido se depositó en tubos cónicos de 1.5 ml e inmediatamente se congelaron a -20°C, temperatura en la cual permanecieron hasta la determinación de las concentraciones de estradiol.

5.5.3.2. Ovarios y úteros: Por su parte, los ovarios y el útero de cada animal se disecaron y limpiaron del tejido que los rodea e inmediatamente después, el par de ovarios y el útero se pesaron de forma independiente en una balanza analítica (Explorer Ohaus, Modelo E00640).

5.5.3.3. Diseño: El diseño experimental comprendió al grupo control (n=4) que recibió únicamente solución salina fisiológica. Como estándar I de eCG se utilizó eCG comercial (Folligon, Intervet, México), que se aplicó en dosis distinta a tres grupos de animales (n=12), a saber 12.5, 25.0 y 50UI, respectivamente. Un

segundo estándar utilizó la eCG comercial Serigan (Sanfer- México), que también se usó en tres dosis distintas 20, 30 y 50 UI (n=12), respectivamente. Los productos problemas en el caso de las gestaciones equinas correspondieron a la fracción CM-3ab (n=12) obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico (sección 3) del suero de yegua, y se administraron a las dosis de 25, 50 y 100  $\mu$ g de proteína/ animal, y para las gestaciones de burra se evaluaron las fracciones CM-2ab (n=12) y CM-3ab (n=12) obtenidas de la purificación en el intercambiador catiónico a partir de suero de burra, probándose a la dosis de 100 y 400  $\mu$ g de proteína/animal.

5.6. Análisis estadístico: La concentración de cada hormona se comparó mediante un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, tomando como referencia el pico de producción de la hormona; semana 8 para eCG y semana 9 para progesterona.

## 6. Resultados

### Actividad Ovárica

La presencia de cuerpos lúteos registrada en gestaciones de burro fue menor a la presentada en gestaciones de caballo. En la figura 1 se observa que 8 de las 8 yeguas presentaron por lo menos un cuerpo lúteo suplementario adicional a su cuerpo lúteo primario, mientras que en el grupo de gestaciones de burro sólo 5 de ellas presentó dicha ovulación. Como sabemos los cuerpos lúteos suplementarios pueden diferenciarse entre cuerpos lúteos secundarios y cuerpos lúteos accesorios dependiendo si son producto de una ovulación o de sólo un proceso de luteinización. Para este estudio, todos los cuerpos lúteos adicionales al cuerpo lúteo primario que se presentaron en cada uno de los animales en experimentación se tomaron como cuerpos lúteos suplementarios sin hacer diferencias entre ellos.

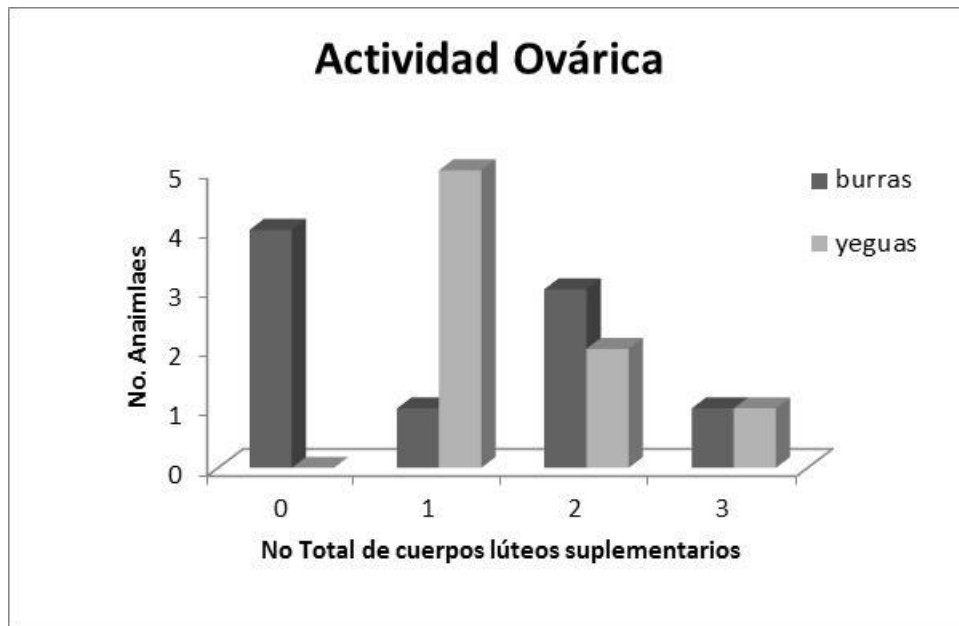


Figura 1. . Distribución del número de cuerpos lúteos suplementarios durante la gestación temprana en yeguas (n=8) y burras (n=9) posterior a cruza intra-especie.

## Determinación Hormonal

*Gestación equina:* En la Figura 2 se muestra el patrón de las concentraciones séricas de progesterona y eCG a través del tiempo en gestaciones de yeguas cruzadas con caballo. En esta figura se observa que a partir de la séptima hasta la novena semana de gestación hubo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de eCG (valor máximo de  $469 \pm 169.08$  UI/ml en la semana 8) con relación a los valores promedio general. Por su parte, la progesterona registró siempre concentraciones por arriba de 10 ng/ml (promedio general de  $15.33 \pm 3.54$  ng/ml) mostrando un incremento ( $P < 0.05$ ) durante la semana nueve inmediatamente después del pico de eCG

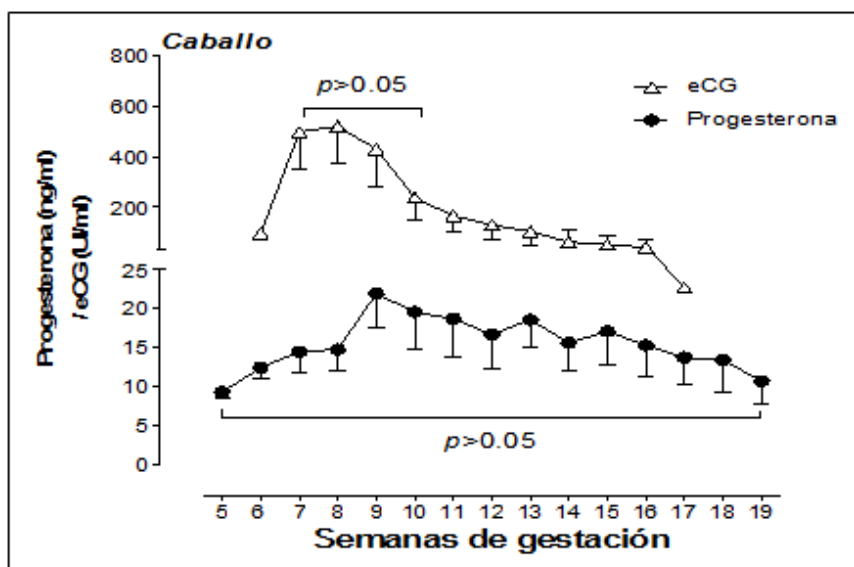


Figura. 2. Concentraciones séricas de progesterona y de eCG en suero de yeguas gestantes por cruzamiento con caballo. Cada punto del gráfico, representa el promedio  $\pm$  EE de ocho animales. Las concentraciones hormonales a través del tiempo se compararon mediante análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, tomado como referencia el pico de producción de la hormona; semana 8 para eCG y semana 9 para progesterona

*Gestación asnal:* En la Figura 3 se presentan las concentraciones séricas de progesterona las cuales no mostraron diferencias a través del tiempo ( $P > 0.05$ ); media general de  $26.49 \pm 2.97$  ng/ml. En el caso de gestaciones de burra, no fue posible determinar las concentraciones séricas de dCG, debido a que el estuche de ensayo inmunoenzimático con el que se contaba es específico para eCG y no detecta la dCG.

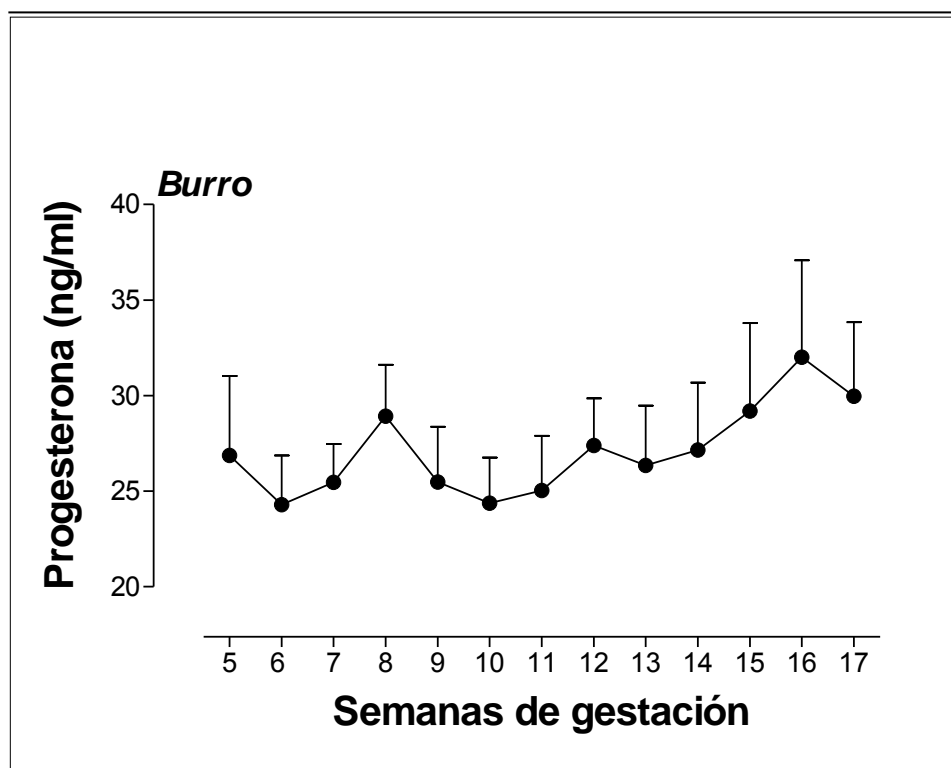


Figura. 3. Concentraciones circulantes de progesterona en suero de burra restante por inseminación con semen de burro. Cada punto del gráfico, representa el promedio  $\pm$  EE de nueve animales. No hubo diferencias entre muestras a través del tiempo  $P > 0.05$

Extracción y purificación de la eCG ( Lote preliminar)

*Extracción:* En el cuadro 1 se resumen los productos obtenidos durante el procedimiento. Con este sistema se logró recuperar 790mg de proteína que corresponden al 84% de proteína total analizada, siendo el precipitado inicial (PPO-1) el que mostró el mayor rendimiento de proteína con el 71.3% equivalentes a 670mg de proteína, sin actividad específica de eCG. Por su parte el producto denominado eCG cruda presentó un rendimiento inferior del 12.76% equivalentes a 120mg de proteína con una actividad específica de 57 UI/mg de proteína, resultado 7.05 veces superior al observado en el suero de origen.

Cuadro 1. Rendimiento durante la extracción de la eCG en suero de yegua gestante inseminada con semen de caballo			
<b>Producto</b>	<b>Proteína Total (mg)*</b>	<b>Inmunoreactividad (eCG UI/mg proteína)**</b>	<b>eCG Total (UI)</b>
<b>Suero</b>	940	8.08	7595.2
<b>PPO-1</b>	670	ND	ND
<b>eCG cruda</b>	120	57	6840

\* Estimada por el método de Bradford.  
\*\* Estimada mediante el estuche comercial (EIA-1298 PMSG, ELISA that's perform, DRG Instruments GmbH, Germany).

*Purificación:* Una vez identificada y conocida la inmunoreactividad de eCG en la fracción extraída del suero y denominada eCG cruda, se procedió a su purificación mediante el intercambiador catiónico (CM-Sepharosa), cuyo patrón de elución se presenta en la figura 4.

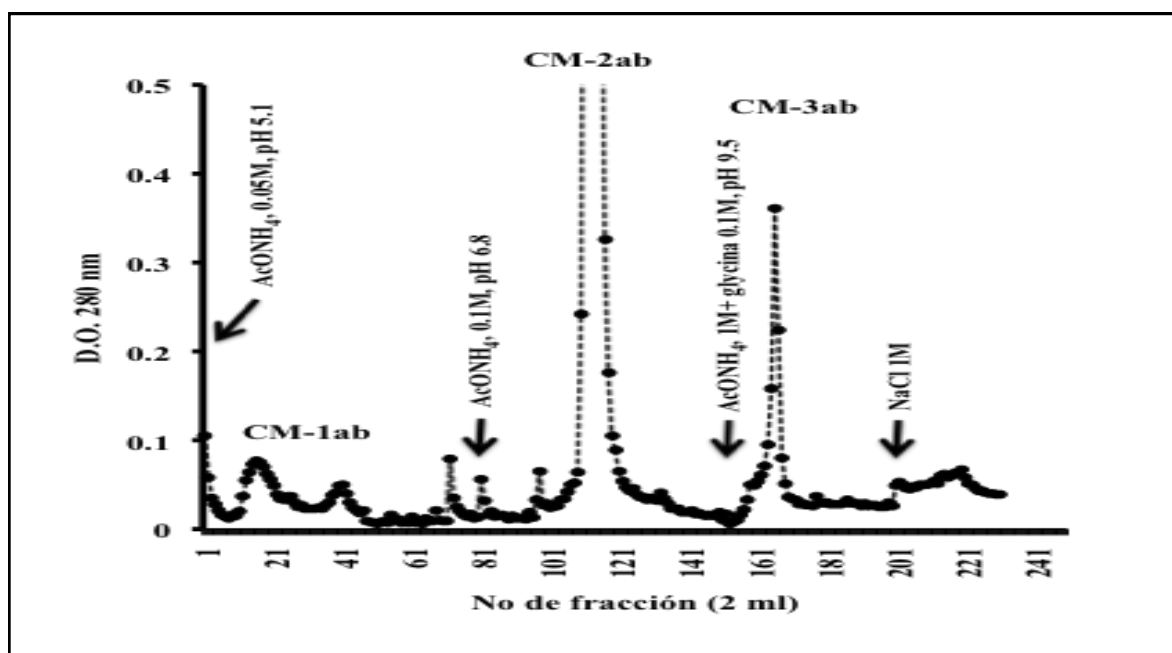


Figura. 4 Patrón de elución de la GC cruda del suero de yegua gestante, en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). Para ello se aplicaron 120 mg de proteína en la columna (1.5 x 27) equilibrada con acetato de amonio 50mM pH 5.1 y eluída con un flujo de 23ml/h. La fracción no retenida en la columna denominada CM-1ab eluyó con este amortiguador, mientras que las fracciones CM-2ab y CM-2cd se obtuvieron con acetato de amonio 0.1 M pH 6.8, la fracción CM-3ab se obtuvo con acetato de amonio 1M más glicina 0.1M pH 9.5. Se colectaron fracciones de 2ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280nm.

Con el gradiente de concentración de acetato de amonio aplicado a la columna, se observó un patrón de distribución de cuatro fracciones de proteína identificadas a 280nm, una de ellas obtenidas con el acetato de amonio 0.05M, pH 5.1 (CM-1ab), una segunda fracción con acetato de amonio 0.1M, pH 6.8 (CM-2ab) y finalmente con acetato de amonio 1.0M+glicina 0.1M, pH 9.5 se obtuvo la tercera fracción designada como



CM-3ab. Con la aplicación de 1M de NaCl al término de la corrida cromatográfica se eluyó una pequeña fracción de proteína. Con este procedimiento se recuperaron 88.32mg de proteína que corresponden al 73.6% de la proteína total, siendo la fracción CM-2ab la que presentó el mayor porcentaje de recuperación con 86.02 mg de proteína con un actividad específica de eCG de 2.35 UI/mg de proteína. En contraste, la fracción CM-3ab presentó una recuperación de 1.37mg de proteína con una actividad específica de 308 UI/mg de proteína, 131 veces superior a la actividad presentada por la fracción CM-2ab. Por su parte la fracción obtenida con el primer amortiguador (CM-1ab) y la proteína obtenida con 1M de NaCl, presentaron 4.45 y 36.35UI de eCG/mg de proteína respectivamente. El cuadro 2 concentra los resultados.

Cuadro 2. Rendimientos durante la purificación de eCG de suero de yegua gestante inseminada con semen de caballo			
Producto	Proteína total (mg)	eCG UI/mg proteína	eCG total (UI)
<b>eCG cruda</b>	120	57	6840
<b>CM-1ab</b>	0.546	4.45	2.43
<b>CM-2ab</b>	86.02	2.35	202.14
<b>CM-3ab</b>	1.37	308	421.96
<b>NaCl</b>	0.39	36.35	14.17

\* Determinación de proteínas totales por el método de Bradford  
 \*\*La determinación de eCG se determinó mediante un estuche comercial (EIA- 1298 PMSG, ELISA that perform, DRG Instruments GmbH,Germany)  
 \*\*\*La recuperación total en este paso de extracción fue del 73.6% (120mg proteína/ 88.32mg de proteína recuperada)

### Extracción y purificación de la eCG (Lote Final)

*Extracción:* Implementada la metodología de extracción y purificación de la eCG del suero de yeguas gestantes, se procedió a la obtención del lote final a partir de 7 g de suero liofilizado. El cuadro 3, resume el porcentaje de recuperación de las distintas fracciones durante el proceso de extracción. El porcentaje de recuperación representó el 92.28%, siendo nuevamente la fracción denominada PPO-1 la que presentó el mayor porcentaje de proteína recuperada durante la extracción con el 61.8%; La fracción denominada eCG cruda correspondió al 30.5% del total de proteína recuperada durante la extracción, con una actividad específica de eCG de 13.89 UI/mg de proteína.

Cuadro 3. Rendimientos de los productos obtenidos durante la extracción de eCG de suero de yegua gestante inseminada con caballo (lote final).

<b>Producto</b>	<b>Proteína Total (mg)*</b>	<b>eCG UI/mg proteína**</b>	<b>eCG Total (UI)</b>
<b>PPO-1</b>	4067	-----	-----
<b>eCG cruda</b>	2006	13.89	27863.34

\*Determinación de proteínas totales por el método de Bradford

\*\*La determinación de eCG se determinó mediante un estuche comercial (EIA-1298 PMSG, ELISA that perform, DRG Instruments GmbH, Germany)

\*\*\*La recuperación total fue 6073mg de proteína

---- No determinada durante el estudio

*Purificación:* Debido al alto contenido de proteína (2.006g) de la fracción eCG cruda, se recurrió para sus análisis a disolver la muestra en 40 ml de agua desionizada, centrifugarla y el volumen total dividirlo en tres lotes. El lote A consistió de 57 mg de proteína, el lote B de 119 mg de proteína y el lote C de 375 mg de proteína. El lote A y C se purificaron de forma independiente de acuerdo al procedimiento antes descrito. En la figura 5 se presenta el análisis cromatográfico de los lotes antes mencionados, cuyo patrón de

elución de proteína a 280nm se agrupó en tres fracciones de acuerdo a amortiguador de elución.

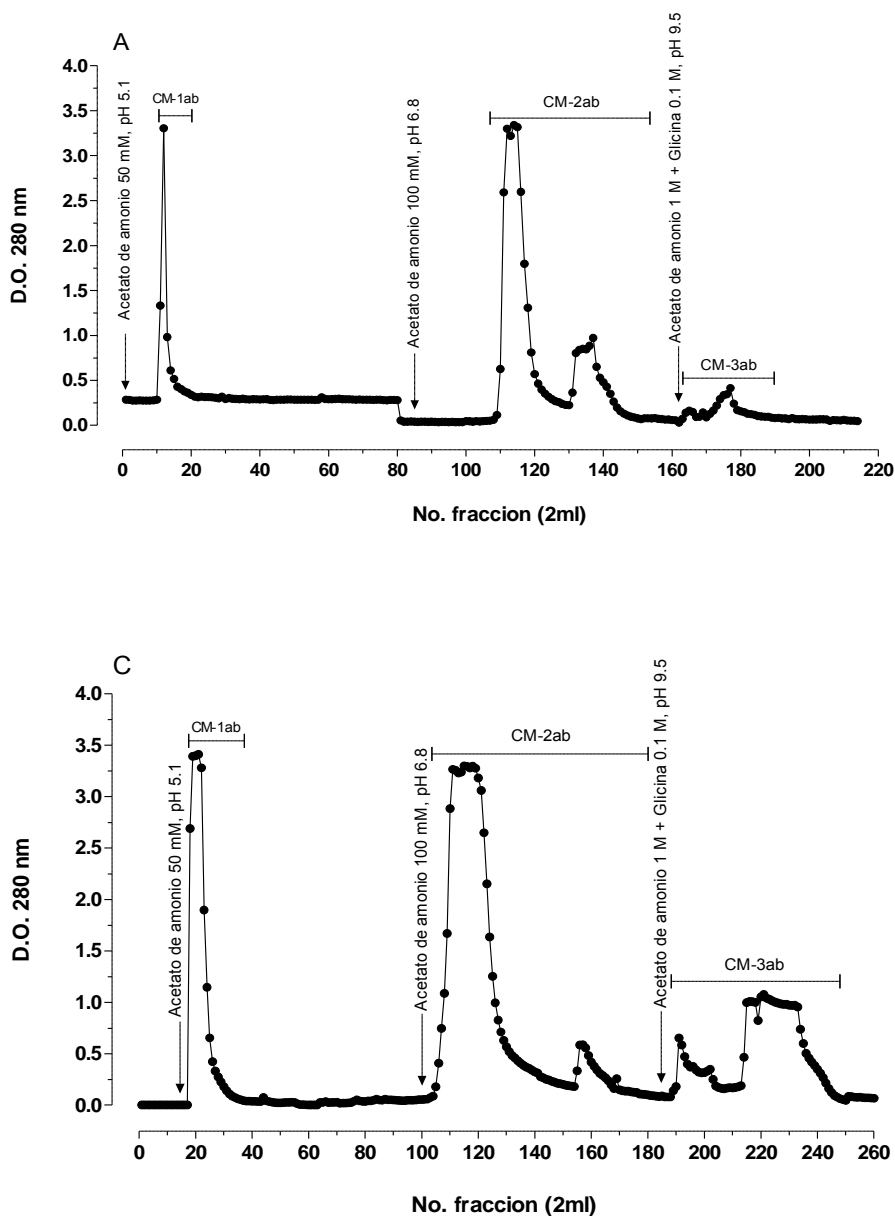


Figura. 5 Patrón de elución de la GC cruda en los tres sublotes en que se dividió el lote final de este estudio. En cada sub-lote se utilizó una columna (1.5cm de diámetro x 27 cm de longitud), previamente equilibrada con acetato de amonio 0.05M, pH 5.1 con un flujo de 23ml/h y se colectaron fracciones de 2ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280nm. En términos generales las fracciones designadas como CM-1ab, CM, 2ab y CM 3ab, se obtuvieron con acetato de amonio 50 M, pH 5.1, acetato de amonio 100mM, pH 6.8 y acetato de amonio 1M en presencia de glicina 0.1M, pH 9.5, respectivamente.

El cuadro 4 resume los resultados durante este paso. Los rendimientos de proteína en ambos, mostraron un porcentaje de recuperación del 88.1% y 80%, respectivamente. La fracción eluída con el segundo amortiguador a pH 6.8 en ambos lotes mostró el mayor porcentaje de recuperación de la proteína en el sistema con 81.9% y 74.6%, respectivamente y una actividad específica de eCG de 276.9UI/mg (Lote A) y 4461.5 UI/mg (lote C). La fracción CM-3ab presentó un porcentaje de recuperación del 4% y 3.5%, respectivamente y una actividad de 16.5 UI/mg (lote A) y 4144 UI/mg para el lote C.

Cuadro 4. Resultados que resumen el rendimiento de proteína\* y su actividad específica de eCG en cada producto recuperado durante la purificación del lote final de eCG, que para su análisis se dividió en tres lotes

Producto	<u>Lote A</u>			<u>Lote C</u>		
	Proteína	eCG/mg	eCG Total	Proteína	eCG/mg	eCG Total
	(mg)	(UI)	(UI)	(mg)	(UI)	(UI)
<b>CM-1 ab</b>	1.27	ND	ND	6.3	ND	ND
<b>CM- 2ab</b>	46.7	5.93	276.9	280.6	15.9	4461.5
<b>CM-3ab</b>	2.33	7.08	16.5	13.34	310.7	4144.73

\*Determinada por el método de Bradford, utilizando como referencia albúmina sérica bovina (BSA)

\*\* La cuantificación inmunoreactiva se determinó mediante un estuche comercial EIA-1298 (PMSG ELISA) that perform, DRG Instruments, GmbH, Germany)

### Heterogeneidad de la eCG

Una vez purificada la eCG se analizó su heterogeneidad molecular mediante cromatoenfoco. Para este análisis, se utilizaron 14mg de proteína de la fracción CM-3ab del lote C, que contenían 310.7 UI/mg de proteína. El sistema presentó una recuperación de 27.28%, cuyo cromatograma de elución se presenta en la figura 6, patrón muy heterogéneo y poco definible a 280nm, por lo que el análisis se realizó por unidad de pH. En el cuadro 5 se muestran los resultados de cada isoforma obtenida durante este procedimiento. La figura 7 resume el análisis por grupo de isoformas el cual confirmó que más del 80 % de la proteína inmunoreactiva a eCG se distribuyó a pH ácido, en tanto que las fracciones básicas y neutras entre ellas no presentaron diferencias significativas en su porcentaje de distribución.

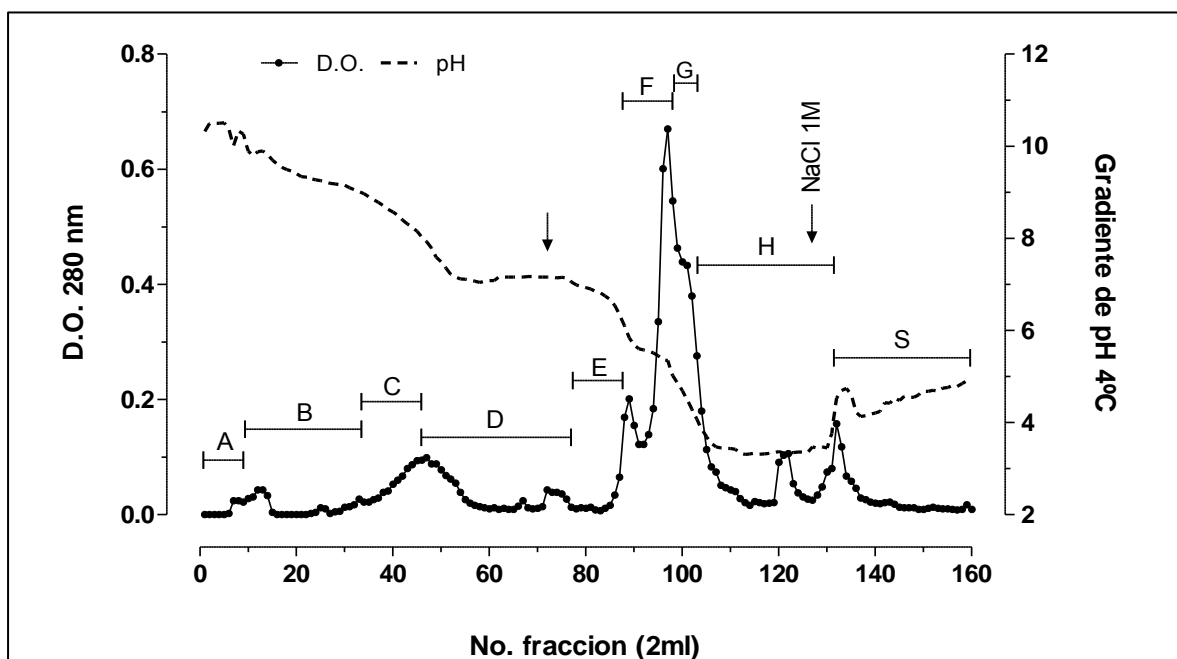


Figura. 6 Patrón de elución y gradiente de pH de la fracción CM-3ab obtenida a partir de suero de yegua gestante por inseminación con caballo. La columna de intercambio iónico (PBE-118), fue equilibrada previamente con 0.025 M de trietilamina-HCl, pH 11.0. La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10.5-3.5 y se colectaron fracciones de 2ml. Las flechas indican el momento de cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y después de la aplicación del NaCl 1M

Cuadro 5. Promedio  $\pm$  DE de la concentración de isoformas de eCG y de proteína total en la hormona eCG purificada a partir de suero de yegua gestante inseminada con semen de caballo

Isoforma	Punto		mUI eCG/ $\mu$ g proteína	mUI eCG totales
	Isoeléctrico			
<b>A</b>	10.6 - <b>10.25</b>	-10.2	1.38 + 0.37	25.09 + 6.6
<b>B</b>	9.9- <b>9.45</b>	-9.1	32.74 + 10.3	8181.8 + 2573.8
<b>C</b>	8.9 - <b>8.49</b>	-8.1	3.38 + 0.2	1442.6 + 86.4
<b>D</b>	7.9- <b>7.49</b>	-6.8	8.15 + 0.51	5311.98 + 1633.6
<b>E</b>	6.6- <b>6.54</b>	-6.1	4.3 + 1.06	2151 + 532.1
<b>F</b>	5.8- <b>5.43</b>	-5.0	9.22 + 2.82	1374.8 + 420.4
<b>G</b>	4.9- <b>4.46</b>	-4.1	4.65 + 2.11	6230 + 2831.9
<b>H</b>	3.8- <b>3.35</b>	-3.5	201.79 + 36.97	60099.11 + 11009.8

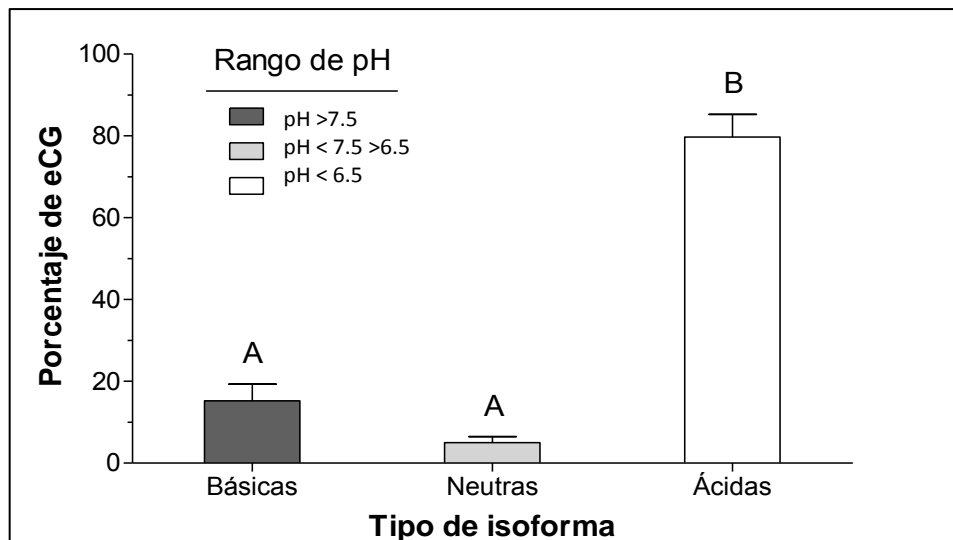


Figura. 7 Patrón de distribución porcentual de las isoformas de eCG en suero de yegua gestante inseminada con semen de caballo, agrupadas de acuerdo a su pH de elución.. La proporción de cada tipo de isoforma se comparó mediante un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. <sup>A,B</sup> literales distintas entre columnas indican diferencias significativas al nivel de  $p < 0.001$

### Extracción y Purificación de la Gonadotropina coriónica de burra

*Extracción* El cuadro 6, resume el número de fracciones obtenidas durante la extracción de la dCG. El procedimiento fue similar al desarrollado para la eCG. Los resultados indicaron un porcentaje de recuperación del 53% equivalente a 6.84mg de proteína, del cual el 25.3% (3.48mg) correspondió a la fracción denominada GC cruda.

Cuadro 6. Rendimiento durante la extracción de Gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de burra inseminada con semen de burro

<b>Producto</b>	<b>Liofilizado (mg)</b>	<b>Proteína Total (mg)*</b>	<b>Recuperación (%)</b>
<b>Suero</b>	831	5650	100
<b>PPO-1</b>	336	1570	27.78
<b>dCG Cruda</b>	348	1430	25.30

\* Estimada por el método de Bradford

*Purificación.* Para este proceso, fue necesario dividir la muestra de la fracción dCG cruda debido a la concentración de proteína total contenida en la misma. La figura 8 presenta el patrón de elución de la fracción GC cruda de burra en una cromatografía de intercambio catiónico (CM- Sepharosa), las proteínas presentes en esta fracción se distribuyeron en cinco fracciones identificadas a 280nm, la primera fracción eluída con acetato de amonio 0.05M pH5.1 (CM-1ab), dos fracciones con el acetato de amonio 0.1M pH6.8 (CM-2ab y CM-2cd) y dos fracciones con acetato de amonio 1.0M + Glicina 0.1M, pH9.5 (CM-3ab y CM-3cd), con la aplicación de 1M de NaCl se recuperó una fracción no incluida en el análisis. El cuadro 7 resume el rendimiento de cada fracción.

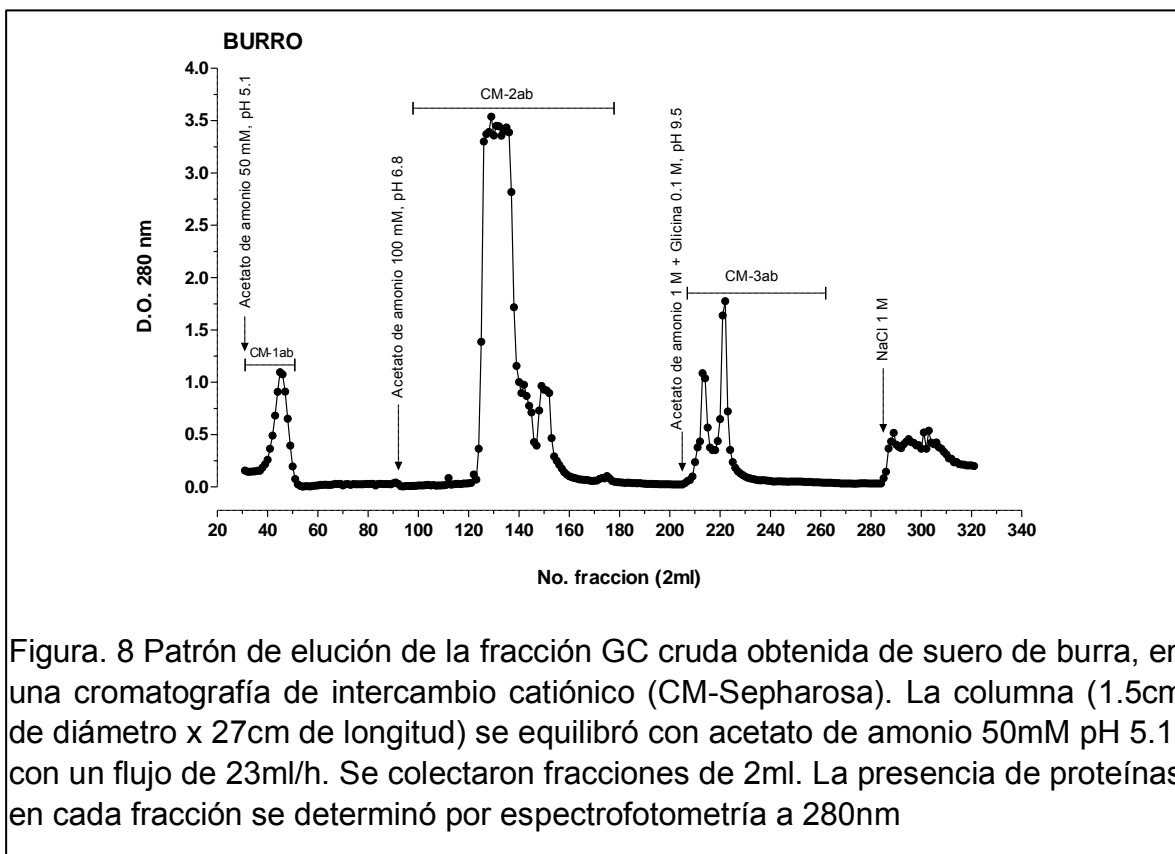


Figura. 8 Patrón de elución de la fracción GC cruda obtenida de suero de burra, en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna (1.5cm de diámetro x 27cm de longitud) se equilibró con acetato de amonio 50mM pH 5.1, con un flujo de 23ml/h. Se colectaron fracciones de 2ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280nm

Cuadro 7. Rendimiento durante la purificación de Gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de burra gestante inseminada con semen de burro

Fracción	Proteína Total (mg)*	Recuperación (%)**
dCG cruda	715	100
CM- 1ab <sup>a</sup>	2.56	0.35
CM-2ab <sup>b</sup>	3.36	0.47
CM-3ab <sup>c</sup>	7.82	1.09
NaCl <sup>d</sup>	247.6	34.54

a,b,c, estas fracciones no se pudieron pesar y fueron resuspendidas en 400µl de H<sub>2</sub>O después de lo cual mediante un análisis de Bradford se estimó la concentración de proteína total en cada una de las fracciones

d de esta fracción se obtuvieron 130.3mg de polvo

\*Estimada mediante el método de Bradford

\*\* La recuperación en este paso fue del 36.45% (715mg de proteína/261.34mg de proteína recuperada)



### Actividad Biológica de la eCG y dCG

Aunque la fracción de proteína denominada CG cruda, obtenida del suero de burra gestante y analizada en la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa) mostró un patrón de distribución similar al de la yegua, no fue posible estimar la concentración (inmunoreactividad) de CG mediante el sistema ELISA utilizado. Debido a lo anterior, las fracciones CM-2ab y CM-3ab obtenidas durante el proceso de purificación se sometieron a un bioensayo en rata específico para actividad de eCG (incremento del peso del ovario y útero en rata prepúber y concentraciones circulantes de estradiol). En el bioensayo también se incluyó la fracción CM-3ab de suero de yegua gestante. La figura 9 resume los resultados obtenidos en el bioensayo. Los resultados del bioensayo para los dos productos comerciales (Folligón® de Laboratorios Intervet y Serigan® de Laboratorios SANFER) indican un efecto dosis/dependiente para peso del ovario, peso del útero y concentración circulante de estradiol.

En cuanto a las proteínas purificadas en nuestro laboratorio, CM-3ab de yegua y CM-2ab y CM-3ab de burra no se observó efecto sobre las concentraciones circulantes de estradiol. Sin embargo en lo que respecta a la CM-3ab de yegua, si se presentó una respuesta de incremento dosis dependiente en el peso ovárico y uterino. Estos incrementos aparentemente estuvieron asociados con un aumento en la edematización del tejido uterino y en el número y tamaño de folículos ováricos. En el caso de los productos obtenidos a partir de la purificación de suero de burra gestante (CM-2ab y CM-3ab) no se encontraron respuestas en el bioensayo. Lo anterior, a pesar de que la dosis de proteína administrada fue mayor que en el caso de los productos obtenidos de suero de yegua.

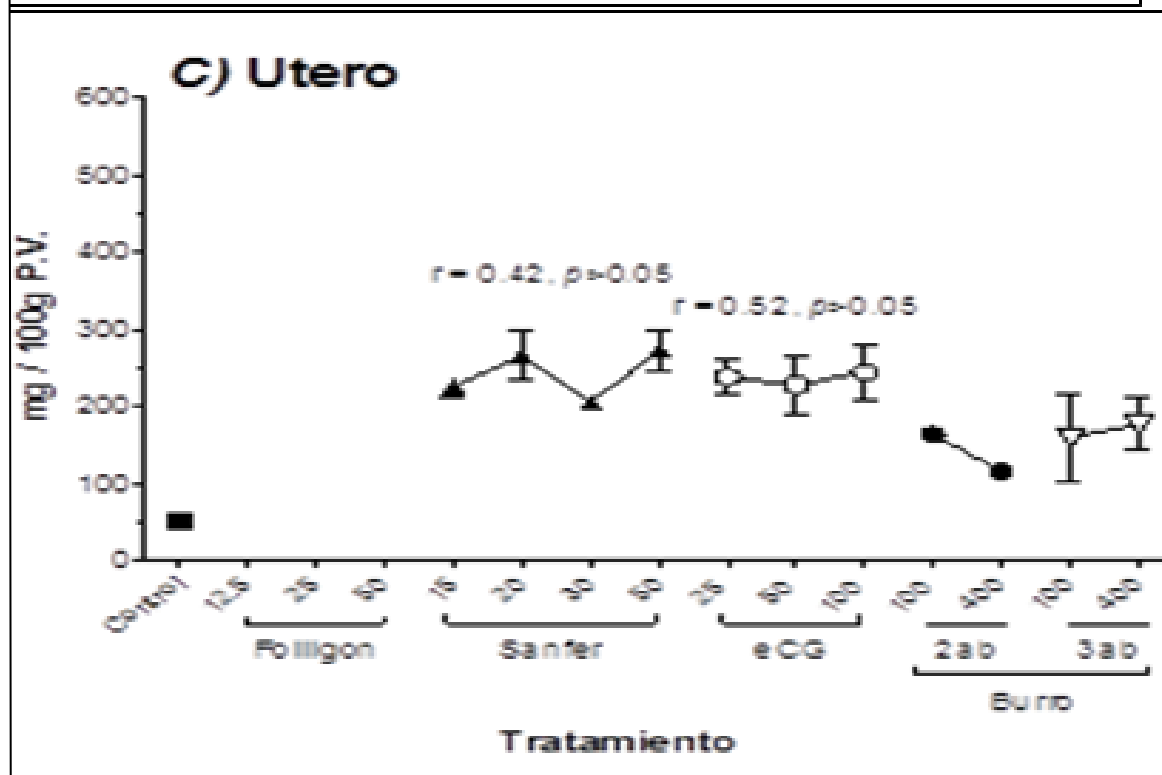
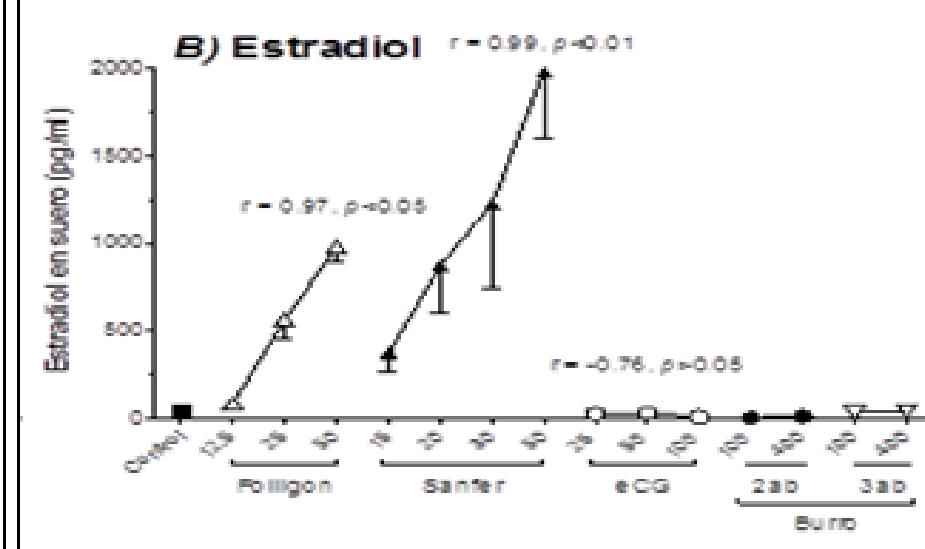
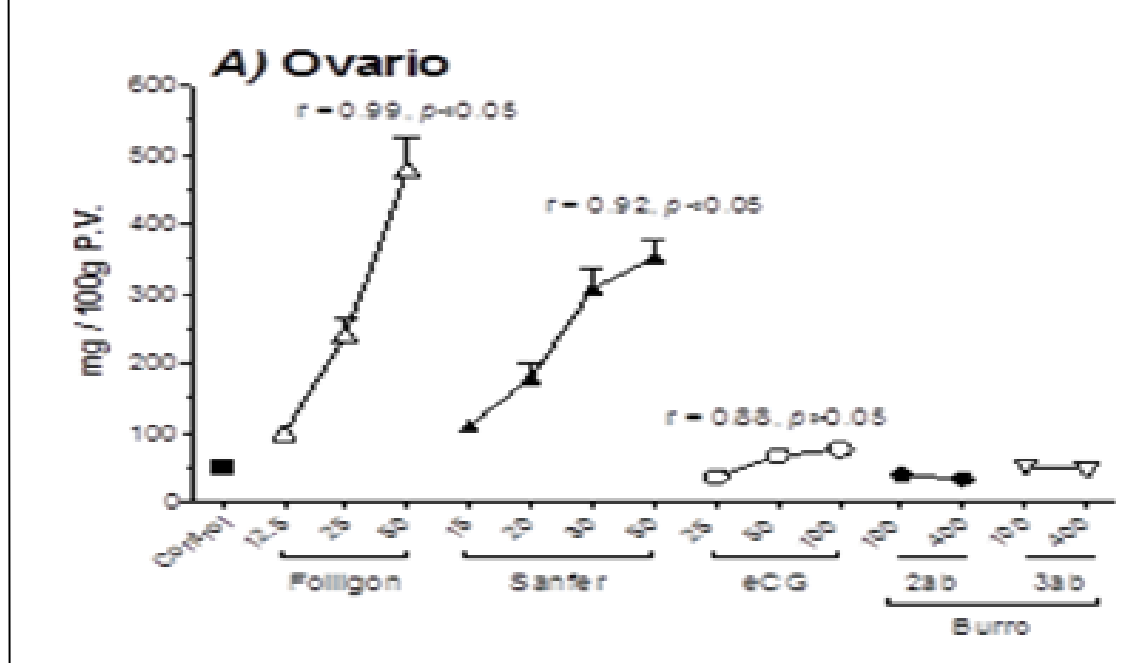


Figura 9. Evaluación de las fracciones CM-3ab (eCG) de la cruce intra-especie yegua-caballo y, 2ab y 3ab de la cruce intra-especie burra-burro, en donde A) peso ovárico B) estradiol C) peso uterino. El efecto de las diferentes dosis de cada tratamiento se comparó mediante un análisis de correlación lineal de Pearson. Se muestra el coeficiente de correlación y su nivel de significancia

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio describen diferencias en el patrón de actividad ovárica y secreción de progesterona entre las gestaciones intra-especie equinas, yegua vs. burra.

Se presenta el análisis de la heterogeneidad de la gonadotropina coriónica de suero equino, patrón con un mayor porcentaje de proteínas ácidas y un bajo porcentaje de proteínas neutras y básicas. El análisis de la heterogeneidad de la gonadotropina coriónica de suero asnal no se realizó debido a los inconvenientes de no contar con una técnica analítica ni biológica que nos indicara la presencia de dCG en las muestras trabajadas

### Actividad Ovárica

El número de cuerpos lúteos accesorios registrados en las gestaciones de burra fue menor al observado en gestaciones de yegua, dichos resultados coinciden con lo reportado por Allen (1981) y difieren de lo reportado por Meira y col. (1998). Estos últimos autores observaron que el 100% de las burras gestantes presentaban al menos 2 cuerpos lúteos accesorios, sugiriendo que la presencia de éstos se debe primeramente al estímulo provocado por la FSH y finalmente a la dCG que proporciona el estímulo para el proceso de luteinización. Es importante aclarar que las estructuras lúteas observadas en el estudio realizado por Meira y colaboradores, fueron el producto de luteinización de folículos que no ovularon y que se hicieron aparentes alrededor del día 41 post-estro, momento en el cual normalmente se inicia la síntesis y secreción de la dCG. Los resultados de Meira y colaboradores. (1998), no concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde sólo el 55% de las burras desarrolló cuerpos lúteos accesorios debido. Por su parte, Allen y col. (1981), reportan una baja incidencia de cuerpos lúteos accesorios a lo largo del primer trimestre de gestación en burras, este fenómeno lo provoca las bajas concentraciones circulantes de dCG que presenta la burra (Allen et al., 1981), como se demostró en la sección de resultados; además Stewart y Allen (1981) mencionan que probablemente esté influyendo la estructura de la gonadotropina. Estos autores concluyen, al igual que nosotros, que el desarrollo de cuerpos lúteos accesorios en ambas especies es por acción de la gonadotropina coriónica durante el primer tercio de la gestación.

Ahora bien, la aparición de cuerpos lúteos suplementarios en equinos se observó después de la quinta semana, resultados que coinciden con lo reportado por Boeta y Zarco

(2005), quienes encontraron que el 100% de las yeguas estudiadas presentaron la formación de 1 o 2 cuerpos lúteos suplementarios a partir de la quinta semana de gestación.

### Concentraciones Séricas

En el grupo de gestaciones de embrión caballo, las concentraciones séricas de progesterona mostraron un marcado aumento a partir de la sexta semana de gestación, incrementando su concentración de 9 a 14ng/ml entre la semana 5 y 6 y llegando a un máximo en la semana 9 (20.95ng/ml). Este patrón de concentraciones circulantes de progesterona se ve influenciado con la aparición de las concentraciones séricas de la eCG, donde podemos afirmar que mientras la eCG se encuentra en niveles máximos, la progesterona de igual manera presenta sus máximas concentraciones, y cuando las concentraciones de eCG disminuyen, las concentraciones de progesterona aunque también disminuyen no desaparecen manteniéndose así probablemente hasta el fin de la gestación. Estos resultados son similares a los encontrados por varios autores, quienes observaron que el marcado incremento de la progesterona a partir del día 39 está determinado por el inicio en la síntesis y secreción de la eCG (Allen y Stewart, 1993; Allen 2000 y Boeta et al, 2005).

En el caso del grupo de burras gestantes la concentración sérica de progesterona se mantuvo relativamente constante a través del periodo experimental, con una concentración promedio de  $26.49 \pm 2.97$ ng/ml. Los resultados obtenidos durante este estudio no coinciden con lo que hasta el momento ha sido reportado por diferentes autores como Sheldrick (1977), Stewart (1981) y Meira (1998), los cuales indican que las concentraciones circulantes promedio de progesterona en burras se encuentra entre 12-17ng/ml. Esta diferencia puede deberse a diversos factores entre los cuales cabe destacar que los cuerpos lúteos suplementarios que se forman a partir de folículos hemorrágicos anovulatorios presentan una secreción de progesterona muy elevada (datos no publicados López F. 2012) Por otro lado, otro factor relevante pueden ser las características individuales propias de los animales como lo son la edad, nutrición, raza, talla, peso y número de gestaciones previas; y por último aunque no menos importante, podemos incluir las características del sistema RIA utilizado para la determinación de progesterona.

Ahora bien, las concentraciones séricas de progesterona en ambos grupos es diferente. En la yegua, la concentración sérica de esta hormona presenta un pico en la semana 9 de la gestación para declinar paulatinamente. En la burra, aunque no presenta ningún pico máximo de concentración como en la yegua, se puede apreciar que sus concentraciones de progesterona son mucho mayores cuando se le compara con las concentraciones presentadas en el grupo de yeguas gestantes. Este patrón de secreción de progesterona en ambos grupos coincide por lo descrito en sus estudios por Stewart en 1981.

Por otro lado, como ya se mencionó en los resultados, el análisis de las concentraciones de la gonadotropina coriónica de burro no fue posible determinarlo debido a la baja especificidad del anticuerpo para dCG, o bien debido a la baja sensibilidad del sistema ELISA utilizado para este estudio, que no fue capaz de detectar los niveles circulantes por debajo de su límite de detección. Aun así, Stewart en 1981 demostró que las concentraciones de dCG son casi 4 veces menores que las reportadas en eCG. En el estudio de Stewart, el análisis de la dCG se realizó mediante un ensayo de inhibición de la hemoaglutinación utilizando para ello un antieCG obtenido en conejo inyectado contra eCG altamente pura, el cual previamente fue descrito para yeguas por el investigador WR Allen (1969b). Esto podría explicar el por qué el sistema ELISA utilizado durante el presente estudio no fue capaz de detectar la inmunoreactividad hacia la dCG en las muestras tomadas a partir de suero de burras gestantes. Hasta este momento es el único dato que se tiene sobre el patrón de secreción en la burra.

### Extracción

La técnica descrita por Schams y Papkoff (1971) y modificada por Aggarwal en 1980 y desarrollada en este estudio, permitió la extracción de una fracción de proteína del suero de yegua gestante con inmunoreactividad de gonadotropina coriónica (eCG) con un rendimiento y actividad inmunológica similar a lo descrito, confirmando a esta metodología como un paso inicial para la obtención de eCG.

### Purificación

La fracción de proteína con actividad de eCG, recuperada durante el proceso de extracción del suero se purificó con el intercambiador catiónico CM-Sepharosa aplicando

un gradiente de acetato de amonio y cambio de pH, procedimiento que permitió la obtención de la fracción de proteína en acetato de amonio 1.0M a pH 9.5 con la mayor concentración de eCG inmunoreactiva, resultado que coincide con la obtención de una fracción rica en hormona luteinizante (LH) de extractos hipofisarios de rumiantes (Perera-Marín et al., 2004; Carranza et al., 1994), así como a una fracción rica en eCG del suero de yegua gestante (Butnev et al., 1996).

Cuando se realizó este procedimiento en diferentes lotes de suero, se observó un patrón de elución similar con los mismos resultados en cuanto a la reactividad inmunológica a eCG, lo que confirma una metodología confiable para la purificación de eCG.

### Heterogeneidad Molecular

El análisis de la heterogeneidad molecular de la fracción obtenida a pH 9.5 se determinó mediante el cromatoenfoco, herramienta analítica que permite separar proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (Keel y Grotjan 1984). Aunque esta metodología es utilizada frecuentemente para identificar las distintas isoformas de las gonadotropinas en extractos hipofisarios de mamíferos (LH y FSH humana, Ulloa-Aguirre et al, 1988; hCG, Lopata et al, 1997; FSH y LH de cebra, Matteri et al 1987; LH bovina, Perera-Marín *et al*, 2008; LH y FSH equina, Matteri *et al*, 1986; Matteri y Papkoff, 1987), en productos finales de purificación de la LH (Ortega-León dato no publicado) y en suero sanguíneo (Perera-Marín et al., 2005); esta metodología hasta donde sabemos no se ha utilizado para identificar el posible patrón heterogéneo de la eCG.

A pesar de ello, con esta herramienta se logró separar a la fracción obtenida de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 9.5 en un patrón de elución que se distribuyó a lo largo del gradiente de pH, que incluyó proteínas con inmunoreactividad a eCG desde un pH muy básico (pH 9.99-9.0) hasta proteínas ácidas eluidas entre un pH 3.99 a 3.5.

Aunque no podemos comparar el patrón de elución de la fracción obtenida a pH 9.5 mediante el cromatoenfoco con patrones de extractos glicoproteicos de hipófisis, es de señalar que a diferencia de lo observado en el patrón de elución de las isoformas de la LH en rumiantes (Arrieta et al., 2006; Perera-Marín et al., 2008) la eCG se distribuyó principalmente en el rango ácido del gradiente de pH aplicado, patrón similar al observado para FSH de mamíferos (Perera-Marín et al., 2008; Ulloa-Aguirre et al 1995).

Esta diferencia en la distribución de las proteínas puede ser debido al tipo de oligosacáridos más que a la estructura de la proteína. Se sabe que existe una alta homología entre la LH hipofisaria equina con la eCG, sin embargo el patrón de glicosilación es totalmente distinto, por ejemplo, la eCG es una proteína altamente glicosilada, con dos sitios de glicosilación tipo N-unidos y seis sitios del tipo O-unidos, además de estos sitios el residuo final de glicosilación conformado por ácido siálico con ramas mono, di o trisialisadas, características que en conjunto le confiere propiedades fisicoquímicas y biológicas muy particulares (Butnev et al, 1996).

Es de destacar que con NaCl 1M después del gradiente de pH se logró obtener una fracción de proteína retenida en la columna con el mayor rendimiento de proteína e inmunoreactividad a eCG. Aunque se ha descrito que las proteínas obtenidas después del NaCl en el cromatofoco y con inmunoreactividad de LH son un artefacto de la técnica (Perera-Marín et al 2005), en este estudio, para evitar la interferencia en el sistema de inmunodetección, la fracción se dializó exhaustivamente durante 48 horas con cambio cada 8 horas de agua desionizada con el fin de eliminar las altas concentraciones de NaCl y las anfolitas, por lo que podemos confirmar que se trata de eCG inmunoreactiva y no un problema metodológico.

### Actividad biológica

Para estimar la actividad biológica de los distintos productos obtenidos de la purificación de ambas hormonas se tomó como base la capacidad de eCG para evocar una respuesta de incremento del tamaño ovárico dependiente de la dosis, dada su actividad de FSH cuando se administra a especies no equinas. Como se presenta en la sección de resultados, la administración del producto purificado a partir de yegua gestante indujo un ligero incremento en el peso del ovario y útero, sin embargo este incremento fue menor que el provocado con las diferentes dosis de los productos comerciales utilizados como estándares. Esto probablemente se deba a la concentración de proteína utilizada durante el bioensayo o cabe la posibilidad de que todo el proceso de extracción y purificación incluidos produjeran cambios severos de pH que hayan desnaturizado a la hormona, de forma que aún fuese detectable inmunológicamente pero hubiese perdido su actividad biológica

Cabe mencionar que al analizar la fracción obtenida con NaCl después de la purificación, esta presentó la mayor concentración a eCG inmunoreactiva, lo cual nos hace pensar que tal vez si se hubiera incluido esa fracción en el protocolo del bioensayo, posiblemente se hubiera obtenido alguna respuesta.

Por otro lado, la aplicación de los productos obtenidos de la purificación del suero a partir de burra gestante (CM-2ab y CM-3ab) no provocó incrementos en el peso del útero y los ovarios, ni en las concentraciones séricas de estradiol. Esto probablemente se deba a que la actividad de la dCG en especies no equinas sea más LH que de FSH, como es el caso de la eCG. Así lo demostró Stewart (1977) en bioensayos de radio receptores realizados en testículos de ratas, donde demostró que la dCG poseía una menor actividad de FSH que la eCG.

## 8. CONCLUSIÓN

De la realización de este estudio se puede concluir que la técnica utilizada para la extracción, purificación y caracterización es la adecuada debido a los rendimientos obtenidos durante el estudio en cada paso del proceso. Además se concluye que la eCG es una hormona heterogénea ya que se pudieron identificar 8 isoformas las cuales eluyeron a pH distinto. Si embargo podemos decir que la eCG es predominantemente una hormona de tipo acídica ya que la mayor concentración de ella se muestra en pH ácido. En el caso de la dCG se concluye que es necesario desarrollar un sistema de identificación inmunológico apropiado, y probablemente modificar la técnica de extracción y purificación. Por su parte con el bioensayo realizado podemos dilucidar que la dCG posee menor actividad de FSH cuando se administra a especies no equinas y que para lograr una respuesta se necesita una concentración mayor a la que se utiliza cuando se administra eCG en especies no equinas.



## 9. ANEXOS

### **Anexo I**

#### *Método de Enzimoensayo (ELISA)*

El ELISA es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de fase sólida basado en el principio de - 60 -ándwich, esta metodología se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

El área de los pozos se encuentra cubierta con un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un sitio antigénico único en la molécula de eCG. Una parte de la alícuota de la muestra del suero que contiene eCG endógeno se incuba en el pozo cubierto. En un segundo paso se incuba el conjugado de la enzima en los pozos. La conjugación desarrollada se lava con agua desionizada. La cantidad de peroxidasa desarrollada es proporcional a la concentración de eCG en la muestra. Agregando la solución del sustrato, la intensidad del color desarrollada es proporcional a la concentración de eCG en la muestra. La metodología se describe como sigue:

1. Asegure el número deseado de tiras revestidas en el sostenedor
2. Dispense 100µl de los Calibradores de PMSG\* en los pozos apropiados.
3. Dispense 100µl de la muestra\*\* en los pozos seleccionados.
4. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente sin agitación
5. Sacuda enérgicamente hacia fuera el contenido de los pozos.
6. Lave los pozos 3 veces con agua destilada
7. Dispense 100µl del conjugado\*\*\* en cada uno de los pozos
8. Incuba por 60 minutos a temperatura ambiente
9. Sacude enérgicamente hacia fuera el contenido de los pozos
10. Lave los pozos 3 veces con agua destilada. Sacuda los pozos en papel absorbente para eliminar gotas de agua residuales
11. Agregue 100µl de la solución sustrato a cada pozo
12. Incube por 30 minutos a temperatura ambiente

13. Agregue 50µl de la solución stop y determine la absorbancia en un espectrofotómetro a una absorbancia de 450nm +/- 10nm. Se recomienda realizar la lectura en los siguientes 30 minutos de haber finalizado el paso 13

\* Calibradores 0UI eCG/ml, 25 UI eCG/ml, 100 UI eCG/ml, 400 UI eCG/ml, 800 UI eCG/ml

\*\* La muestra debe trabajarse en una dilución mínima de 1/10 debido a que se tiene reacción cruzada con LH y FSH en diluciones menores a la mencionada. La dilución de la muestra debe realizarse con el estándar 0

\*\*\* Anti PMSG conjugado con una enzima de rábano picante

## **Anexo II**

### *Método de Radioinmunonálisis para la Cuantificación de Progesterona en Suero*

Coat-A-Count Progesterone es un radioinmunoensayo  $^{125}\text{I}$  en fase sólida para la medición directa y cuantitativa de progesterona en suero o plasma. La progesterona marcada con  $^{125}\text{I}$  compete por un tiempo fijo con progesterona de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared del tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo de la progesterona marcada con  $^{125}\text{I}$ . La lectura del tubo en un contador gamma, proporciona entonces, un número que se convierte por medio de una curva de calibración, en una medida de progesterona presente en la muestra del paciente

Procedimiento:

1. Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15 -28°C) antes de su uso.
2. Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12X75mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica).
3. Tubos recubiertos\*\* Marcar con A (unión máxima) catorce tubos y de B a G por duplicado. Adicionalmente, marcar tubos recubiertos con anticuerpo por duplicado, para controles y muestras de pacientes.
4. Pipetear 100µl del calibrador\* A en los tubos NSB y A y 100µl de cada uno de los calibradores\* B a G en tubos marcados correspondientemente. Pipetear 100µl de cada control y muestra de paciente en los tubos preparados. Las muestras de pacientes susceptibles de contener concentraciones de progesterona mayores a la del calibrador más alto (40ng/ml), deben ser diluidas con calibrador 0 antes de ser analizadas.
5. Añadir 1.0ml  $^{125}\text{I}$  progesterona a cada tubo. Agitar en vórtex y dejar los tubos T a un lado para su conteo.
6. Incubar durante 3 horas a temperatura ambiente (15-28°C)
7. Decantar todos los tubos (excepto los tubos T) y dejar escurrir durante 2 a 3 minutos. Golpear los tubos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
8. Leer durante 1 minuto en un contador gamma

\* Calibradores listos para usarse en matriz de suero humano A (0ng/ml), B (0.08ng/ml), C (0.49ng/ml), D (1.88ng/ml), E (9.8ng/ml), F (18.7ng/ml), G (40ng/ml)

\*\*  $I^{125}$  Progesterona

\*\*\* Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos anti-Progesterona

### **Anexo III**

#### *Cuantificación de Proteínas Totales (Método Bradford)*

##### Curva Estándar

1. Preparar concentraciones de 1, 2, 4, 8, 10, y 20µg de Albumina Sérica Bovina (BSA) por duplicado
2. Preparar concentraciones de 10µl de cada muestra por duplicado
3. Llevar cada solución a un volumen final de 800µl con agua desionizada
4. Agregar 200µl de reactivo Bradford
5. Esperar 5 minutos a que reacciones
6. Leer a 590nm

##### Preparación de Albumina Sérica Bovina

De la solución estándar (BSA 20%) se tomaron 10µl que contienen 2mg de proteína. Esta se ajustó a un volumen de 2ml con agua desionizada para trabajar con una concentración de 1µg/µl de solución.

## 10. LITERATURA CITADA

1. Aggarwal B, Farmer SW, Papkoff H and Seidel GE “Biochemical properties of equine chorionic gonadotropin from two different pools of Pregnant Mare Sera” *Biology of Reproduction* 1980; No. 23; pp. 570-576
2. Aggarwal BB, Farmer SW, Papkoff H, Stewart F, Allen WR. “Purification and characterization of the gonadotropin secreted by cultured horse trophoblast cells” *Endocrinology*. 1980; 106; 6; pp.1755-9.
3. Arrieta E, Porras A, González- Padilla E, Murcia C, Rojas S, Perera – Marín G; “Ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase”; *Endocrinology* 1987; vol 121; No 1; pp 160 - 166
4. Allen WR “The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotrophin. *Journal Endocrinology* 1969b; 43; pp. 593-598
5. Allen WR and Moor R. M. “The origin of the equine endometrial cups I: Production of PMSG by fetal trophoblast cells” *Journal Reproduction Fertility* 1972; vol. 29; pp. 313-316.
6. Allen WR “The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids” *Journal Reproduction Fertility. Supplements* 1975; 23; pp. 405-413.
7. Allen WR, Steven DH “Ultrastructural development of the equine placenta” *Journal Reproduction Fertility Supplements* 1975; 23; pp.575-8
8. Allen WR, “Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effect of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys” *Journal Reproductive Fertility Supplements* 1982; 31; pp.57-94
9. Allen WR, Skidmore JA, Stewart F and Anczak DF “Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids” *Journal Reproduction Fertility* 1993; 97; pp. 55-60
10. Allen WR; “The Physiology of early pregnancy in the mare”; *AAEP proceedings* 2000; vol. 46; pp. 338-354
11. Allen WR, Wilsher S , Turnbull C , Stewart F , Ousey J , Rossdale PD and Fowden AL “Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero” *Reproduction* 2002; 123; pp. 445-453

12. Allen WR, Wilsher S. "A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare"; *Placenta* 2009; vol. 30; pp. 1005–1015
13. Arrieta E, Porrás A, González-Padilla E, Murcia C, Rojas S, Perera-Marín G "ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase" *Reproduction Fertility and Development* 2006; vol. 18; pp. 485-495
14. Bahl OP, Swaminathan N." Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the beta subunit" *Journal Biology Chemistry* 1973; 248; 19; 6810-27.
15. Ball BA, Hillman RB, Woods GL; "Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares"; *Theriogenology* 1987; vol.28; No. 2; pp. 167-174
16. Baenziger JU y Green ED; "Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharide: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin"; *Biochemical et biophysica acta (BBA)-reviews of biomembranes* 1988; vol. 947, No.2; pp. 287-306
17. Baenziger JU, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL, Beranek MC; "Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides"; *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* 1992; vol. 89; No.1; pp. 334-338
18. Baenziger JU; "Glycosylation: to what end for the glycoprotein hormones"; *Endocrinology* 1996; vol. 137; No.5; pp. 1520-1522
19. Bao B and Garverick HA "Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review" *Journal Animal Science* 1998; vol. 76; no. 7; pp. 1903-1921
20. Bielanski W, Ewy Z and Pigiñiowa H "Differences in the level of gonadotrophin in the serum of pregnant mares" In: *Third International Congress of Animal Reproduction Cambridge* 1956; pp. 110-111
21. Blanchard T, Varner D; "Manual of equine reproduction"; 2da edición; 2003; edit
22. Bousfield GR, Ward DN; "Reduction and reoxidation of equine gonadotropin alpha-subunits"; *Endocrinology* 1992; vol. 131; no. 6; pp. 2986-2998
23. Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Mooreb WT; "Structural Features of Mammalian gonadotropins"; *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996; vol. 125; pp. 3-19

24. Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY; "Identification of Twelve O-Glycosylation Sites in Equine Chorionic Gonadotropin  $\beta$  and Equine Luteinizing Hormone  $\beta$  by Solid-Phase Edman Degradation"; *Biology of Reproduction* 2001; vol. 64; pp. 136-147
25. Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY, Nguyen VT, Gray CM, Dias JA, MacColl R, Eisele L, Harvey DJ "Differential Effects of  $\alpha$  Subunit Asparagine<sup>56</sup> Oligosaccharide Structure on Equine Lutropin and Follitropin Hybrid Conformation and Receptor-Binding Activity"; *Biochemistry* 2004; vol. 43; pp. 10817-10833
26. Boeta M, Zarco L; Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys and stallions; *Journal of Equine Veterinary Science* 2005; Vol. 25, No.12: pp 531-538.
27. Burgon PG, Stanton PG, and Robertson DV "In Vivo Bioactivities and Clearance Patterns of Highly Purified Human Luteinizing Hormone Isoforms" *Endocrinology* 1996; Vol. 137; No. 11; pp. 4287-4836
28. Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT, Bousfield GR; "Negative influence of O-linked oligosaccharides of high molecular weight equine chorionic gonadotropin on its luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor-binding activities"; *Endocrinology* 1996; vol. 137; no. 6; pp. 2530-2542
29. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ; *Protein methods*; Wiley-Liss 1996; pp. 415
30. Bradford MM "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *analytical biochemistry* 1976; 72; pp. 248-254
31. Chopineau M, Stewart F, Allen WR; "Cloning and analysis of the cDNA encoding the horse and donkey luteinizing hormone  $\beta$  subunits"; *Gene* 1995; 160; pp. 253-256
32. Chopineau M, Martinat N, Marichatou H, Troispoux C, Auge-Guillou C, Stewart F, Combarous Y and Guillou F "Evidence that the  $\alpha$ -subunit influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotrophins" *Journal of Endocrinology* 1997; 155; pp. 241-245
33. Chopineau M, Martinat N, Pourchet, Stewart F, Combarous Y, Guillou F "Cloning, sequencing and functional expression of zebra (*Equus burchelli*) LH" *Journal Reproduction Fertility* 1999; 115; pp. 159-166.



34. Christakos S and Bahl OP "Pregnant Mare Serum Gonadotropin Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization"; *Journal of Chemistry* 1979; 254; No. 10; pp. 4253-4261,
35. Clegg MT, Boda JM, Cole HH "The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin" *Endocrinology* 1954; vol. 54; No.4; pp. 448-63
36. Clegg MT, Cole HH, Howard CB and Pigon H "The influence of foetal genotype on equine gonadotrophin secretion". *J. Endocrinol.* 1962: 25; pp. 245-248
37. Cole HH "High gonadotrophic hormone concentration in pregnant ponies" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1938; 38; pp. 193-194.
38. Combarous Y "Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors" *Endocrinology Reviews*; 1992; 13; 670-691
39. Corda D, Marcocci C, Kohn LD, Axelrod J, Luini A; "Association of the changes in Cytosolic Ca<sup>2+</sup> and iodide efflux induced by thyrotropin and by stimulation of  $\alpha$ 1-adrenergic receptors in cultures rat thyroid cells"; *The Journal of Biological Chemistry* 1985; vol. 260; no. 16; pp. 9230-9236
40. Cook B, Kaltenbach CC, Norton HW & Nalbandov AV "Synthesis of progesterone in vitro by porcine corpa lutea. *Endocrinology* 1967; 81; pp. 573-581
41. Cook B, Nalbandov AV "The effect of some pituitary hormones on progesterone synthesis in vitro by the luteinized ovary of the common opossum (*Didelphis marsupialis Virginiana*)" *Journal Reproduction Fertility* 1968; 15; 2; pp. 267-75.
42. Daels PF, Shideler S, Lasley BL, Hughes JP and Stabenfeldt GH "Source of oestrogen in early pregnancy in the mare" *Journal Fertility* 1990; 90; pp. 51-60
43. Daels PF, Albrecht BA and Mohammed HO "Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares" *Biology of Reproduction* 1998; vol. 59; No. 5; pp. 1062-1068
44. Davis RJ, Faucher M, Racaniello LK, Carruthers A, Czech MP; "Insulin-like growth factor I epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distincy mechanisms"; *Journal of biological chemistry* 1987; vol. 262; pp. 13126-13134

45. Day, F.T. and Rowlands, I.W. "The time and rate of appearance of gonadotrophin in the serum of pregnant mares" *Journal Endocrinology* 1940; 2; pp. 255-261.
46. Day, F.T. and Rowlands, I.W. "Serum gonadotrophin in Welsh and Shetland ponies" *Journal Endocrinology* 1947; 5; pp. 1-8.
47. Dufau ML; "The Luteinizing Hormone Receptor"; *Annual Reviews Physiology* 1998; vol. 60: pp. 461-496
48. Enders AC, Meadows S, Stewart F, Allen WR "Failure of endometrial cup development in the donkey- in- horse model of equine abortion" *Journal Anatomy* 1996; vol 188; pp 575 - 589
49. Fares FA, Suganuma N, Nishimori K, LaPolt PS, Hsueh AJW, Boime I. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotrophin b subunit to the follitropin b subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992; 89; pp. 4304-4308
50. Fiete D, Srivastava V, Hindagui O, Baenziger JU "A hepatic reticuloendotelial cell receptor specific for  $SO_4-4GalNAc\beta 1, 4GlcNAc\beta 1, 2Man\alpha$  that mediates rapid clearance of lutropin"; *Cell* 1991; vol. 67; pp. 1103-1110.
51. Gigli I, Russo A, Agüero A; "Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos"; *InVet* 2006; vol. 8; No. 1; pp. 183-204.
52. Ginther OJ; "Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus"; *AAEP proceedings* 1998; Vol. 44; pp.73-104
53. Ginther O. J.; "Ultrasonic imaging and animal reproduction" *Equine Veterinary Education* 1995; vol. 7; No. 5; pp. 291,
54. Ginther OJ "Selection of the dominant follicle in cattle and horses" *Animal Reproduction Science* 2000; vol. 60; No. 2; pp. 61-79
55. Gudermann T, Bimbaamera M, Bimbaamera L; "Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and  $Ca^{2+}$  mobilization"; *the journal of biological chemistry* 1992; vol 267; no. 7; pp. 4479-4488.
56. Heap RB, Hamon MH and Allen WR "Oestrogen production by the preimplantation donkey conceptus compared with that of the horse and the effect of between-species embryo transfer" *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 93; pp.141-147

57. Hearn MTW and Gomme PT "Review molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones" *Journal of Molecular Recognition* 2000; 13; 223–278
58. Hwang and KMJ Menon "Characterization of low density receptors in the rat corpus luteum and regulation by gonadotropin". *Journal Biology Chemistry* 1983; 258; p. 8020
59. Jameson JL and Hollenberg AN "Regulation of chorionic gonadotropin gene expression" *Endocrine Reviews* 1993; vol. 14; No. 2; pp.203 – 221
60. Kardana A, Elliott MM, Gawinowicz MA, Birken S, Cole LA "The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). I. Characterization of peptide heterogeneity in 13 individual preparations of hCG" *Endocrinology* 1991; 129; 3; pp. 1541-50.
61. Keel BA, Grotjan HE Jr, 1984. Characterization of rat lutropin charge microheterogeneity using chromatofocusing. *Anal Biochem* 142: 267- 270
62. Krisans SK "Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; Vol. 804; pp. 142–164
63. LeBarbera AR, Rebar RW. "Reproductive peptide hormones: generation, degradation, reception and action" *Clinical Obstetrician Gynecology* 1990; 33; 576-590
64. Legardinier S, Cahoreau C, Klett D, Combarous Yves; Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lesson from recombinant hormone expressed in insects cells; *Reprod. Nutr. Dev.* 2005; Vol. 45: pp. 255-259
65. Lennard S N, Stewart F and Allen WR "Insulin-like growth factor II gene expression in the fetus and placenta of the horse during the first half of gestation" *Journal of Reproduction and Fertility* 1995; 103; pp. 169-179
66. Lopata A, Oliva K, Stanton PG, Robertson DM "Analysis of chorionic gonadotrophin secreted by cultured human blastocysts" *Molecular Human Reproduction* 1997; vol. 3; No. 6; pp. 517-521.
67. Manning AW, Rajkumar K, Bristol F, Flood PF and Murphy BD "Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin" *Journal Reproduction Fertility Supplements* 1987; 35; pp. 389-397.
68. Manzella SM, Shylaja M. Dharmesh, Beranek MC, Swanson P and Baenziger JU. "Evolutionary conservation of the sulfated oligosaccharides on vertebrate glycoprotein

hormones that control circulatory half-life” The Journal of Biological Chemistry 1995; Vol. 270, No. 37pp. 21665- 216671

69. Martín-Rosset W.; “La alimentación de los caballos”; Edit. Aedos; pp. 229; España, 1993

70. Martinuk SD, Bristol F and Murphy BD “Effects of the dam on equine chorionic gonadotropin concentrations during pregnancy” Domestic Animal Endocrinology 1990; 7; pp. 551-557

71. Matsui T, Mizuochi T, Titani K, Okinaga T, Hoshi M, Bousfield GR, Sugino H, Ward DN; “Structural analysis of N-linked oligosaccharides of equine chorionic gonadotropin and lutropin  $\beta$ -subunits”; Biochemistry 1994; vol. 33; pp. 14039-14048

72. Matteri RL, Papkoff H, Murthy HMS, Roser JF and Chang Y “Comparison of the properties of highly purified equine chorionic gonadotropin isolated from commercial concentrates of pregnant mare serum and endometrial cups” Domestic Animal Endocrinology 1986; Vol. 3; No. 1; pp. 39-48

73. Matteri RL, Papkoff H “Characterization of Equine Luteinizing Hormone by Chromatofocusing” Biology of Reproduction 1987; 36; pp. 261-269

74. Matteri RL, Baldwin DM, Lasley BL, Papkoff H “Biological and immunological properties of zebra pituitary gonadotropins: comparison with horse and donkey gonadotropins” Biology of Reproduction. 1987; vol. 36; No. 5; pp. 1134-41.

75. Meira C, Ferreira JCP, Papa FO, Henry M “Ultrasonographic evaluation of the conceptus from days 10 to 60 of pregnancy in jennies” Theriogenology 1998; 49: 1475 - 1482

76. Mönke U and Franz “A investigations on the sex ratio of horse embryos and its importance for PMSG production in mares” Animal Breeders Abstract 1985; 53; Abstract 7359.

77. Moore LG, Chie WNg, Hudson NL and McNatty KP “Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive States” Journal of Endocrinology 2000; 165; pp. 185–192

78. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J & Ashwell G “The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation” Journal of Biological Chemistry 1971; 246; pp. 1461–1467.

79. Murphy BD, Rajkumar K, Bristol F and Flood PF "Equine chorionic gonadotrophin: The effect of sire on immunological and biological activity from day 50-100 of pregnancy" Annual Conference of the Society for the Study of Fertility Aberdeen 1985; p 115
80. Murphy, BD. and Martinuk, SD "Equine chorionic gonadotropin" Endocrinology Reviews 1991; 12; 27-44
81. Niswender GD, Juengel J L, Silva PJ, Rollyson MK, and McIntushew EW "Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum" Physiological Reviews 2000; Vol. 80; No. 1
82. Papkoff H, Bewley TA and Ramachandran J "Physicochemical and biological characterizations of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits"; Biochimica et Biophysica Acta 1978; vol. 532; pp. 185-194
83. Papkoff H "Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. Theriogenology 1981; 15; 1; 1-11.
84. Pate JL and Condon WA "Regulation of steroidogenesis and cholesterol synthesis by prostaglandin F-2 $\alpha$  and lipoproteins in bovine luteal cells" Journal Reproduction Fertility 1989; 87; pp. 439-446
85. Perera- Marín G, Alcántara FA, Murcia MC, Hernández CJ y González PE "Purificación de cinco isoformas de la hormona luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica" Veterinaria México 2004; vol. 35; No. 2; pp. 129-145
86. Perera-Marín G, Murcia C, Rojas S, Hernández-Cerón J, González-Padilla E. "Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in holstein heifers" Animal Reproduction Science. 2005; 86; vol. 1; No.2; pp. 53-69
87. Perera-Marín G, Murcia C, Gonzalez-Padilla E; "Luteinizng hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance"; Animal Reproduction Science 2007; vol.101, pp. 187-207
88. Perera-Marín G, Gutiérrez CG, Murcia MC, León H, González-Padilla E "Progesterone and the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in cattle" Animal Reproduction Science 2008; vol. 104; No. 2-4; pp.164-76
89. Pierce JG, Parsons TF. 1981. "Glycoprotein hormones: structure and function" Reviews Endocrinology 2002; 50; 465-495.

90. Roser F, Papkoff H, Murthy HMS, Chang YS, Chloupek RC and Potes JAC "Chemical, biological and immunological properties of pituitary gonadotropins from the donkey (*Equus asinus*): Comparison with the horse (*Equus caballus*)" *Biology of Reproduction* 1984; vol. 30; pp. 1253-1 262
91. Rowlands IW "Serum gonadotrophin and ovarian activity in the pregnant mare" *Journal Endocrinology* 1949; 6; pp. 184-191
92. Schams D and Papkoff H "Chemical and immunochemical studies on pregnant mare serum gonadotropin" *Biochimica et Biophysica Acta* 1972; vol. 273; pp. 139-148
93. Sheldrick E. L., Wright P. J., Allen W. R. and. Heap R. B "Metabolic clearance rate, production rate, and source of progesterone in donkeys with fetuses of different genotypes" *Journal of Reproduction and Fertility* 1977; 51; pp. 473-476
94. Sherman GB, Wolfe MW, Farmerie TA, Clay CM, Threadgill DS, Sharp DC and Nilson JH "A single gene encodes the 13-subunits of the equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin" *Molecular Endocrinology* 1992; 6; pp. 951-959
95. Smith PT, Bousfield GR, Kumar S, Dorothy, Fiete D, Baenziger JU; "Equine lutropin and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO<sub>4</sub>-4-GalNAc and Siaa<sub>2,3</sub> Gal, respectively"; *The Journal of Biological Chemistry* 1993; vol. 268; no. 2; pp. 795-802
96. Steelman and Pohley, "Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin" *Endocrinology* 1953; vol. 53; no.6; pp.604-16
97. Stewart F, Allen WR, Moore RM; "Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay"; *Journal of Endocrinology* 1976; vol. 71; pp. 371-382.
98. Stewart F and Allen WR "Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophin" *Journal Reproduction Fertility* (1981) 62, 527- 536.
99. Stewart F and Maher, JK "Analysis of horse and donkey gonadotrophin genes using Southern blotting and DNA hybridization techniques" *Journal Reproduction Fertility. Supplements* 1991; 44; 19-25

100. Stewart F., Allen WR “Comparative aspects of the evolution and function of the chorionic gonadotrophins” *Reproduction in Domestic Animals* 1995; Vol. 30; No 4, pp. 231–239

101. Stockell A, Renwick AG; “Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components”; *Biochemistry Journal* 1992; vol. 287; pp.665-679

102. Stout TAE, Lamming GE and Allen WR (2000) “Oxytocin and its endometrial receptor are integral to luteolysis in the cycling mare” *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* ; 56; 281–287

103. Theingi M. Thway and Michael W. Wolfe “An activator protein-1 complex mediates epidermal growth factor regulation of equine glycoprotein a subunit expression in trophoblast cells<sup>1</sup>” *Biology of Reproduction* 2002; 67, 972–980

104. Ulloa-Aguirre A y Timossi C; “ Structure-function relationship of follicle-stimulating hormones and its receptor”; *Human Reproduction update* 1998; vol. 4; no. 3; pp. 260-283

105. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V; “Follicle-stimulating isohormonas: characterization and physiological relevance”; *Endocrine Reviews* 1995; vol. 16; no. 6; pp. 765-787

106. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA; “Role of Glycosylation in Function of Follicle-Stimulating Hormone”; *Endocrine* 1999; vol. 11; no. 3; pp. 205–215

107. Ward DN, Moore WT, Burleigh BD; “Structural Studies on equine chorionic gonadotropin”; *Journal of Protein Chemistry* 1982; Vol. 1; No. 4; pp.263-280

108. Wilsher S and Allen W. R “Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare” *Equine Veterinary Journal* 2011; pp. 1-9

109. Wooding FB, Morgan G, Fowden AL, Allen WR. “A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells”. *Placenta* 2001; 22; vol. 8; No. 9; pp. 749-67.